

**ELICITACIÓN DE RAÍCES NORMALES CULTIVADAS *IN VITRO* DE
Brugmansia candida (SOLANACEAE) CON PRECURSORES DE ALCALOIDES
DEL TROPANO**

**Presentado por
EDWING JAVIER GRAJALES GONZÁLEZ**

**Trabajo presentado como requisito parcial para optar al título de tecnólogo
en Química**

**Directores
JAIME NIÑO OSORIO
OSCAR MARINO MOSQUERA MARTÍNEZ**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PERIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE TECNOLOGIA QUIMICA
PEREIRA
2008**

TABLA DE CONTENIDO

Índice de Figuras	III
Índice de Tablas.....	IV
Resumen	V
Abstract	VI
1.Revisión de la Literatura.....	1
1.1. Metabolitos Secundarios	1
1.1.1.Propiedades Aleloquímicas de los Metabolitos Secundarios	3
1.2. Familia Solanaceae.....	4
1.3. El Género Brugmansia	6
1.4. Alcaloides.....	7
1.4.1 Alcaloides del Tropano	10
1.4.1.1. Biosíntesis de los Alcaloides del Tropano	12
1.4.1.2. Extracción de Alcaloides del Tropano	14
1.4.1.3. Análisis de Alcaloides del Tropano.....	14
1.4.1.3.1. Cuantificación de Alcaloides del Tropano por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)	14
1.4.1.3.2. Cromatografía de Gases	17
1.4.1.3.3. Cromatografía de Capa Delgada	18
1.5. Adición de Precursores	18
1.6. Obtención de Metabolitos Secundarios a Través de la Técnica de Cultivos <i>In Vitro</i>	19
2. Justificación	22
3. Objetivos	24
3.1. Objetivo General	24
3.2. Objetivos Específicos	24
4. Metodología	25
4.1. Materiales	25
4.2. Reactivos	25
4.3. Condiciones Agroclimáticas	26
4.4. Material Vegetal	26
4.5. Diseño Experimental	26
4.6. Preparación de las Muestras	27
4.7. Índice de Crecimiento.....	27
4.8. Extracción de Escopolamina	27
4.9. Condiciones Para la Cuantificación de Escopolamina por HPLC	27

4.10. Soluciones Estándar y Curva de Calibración.....	29
4.11. Parámetros Evaluados Para la Validación del Método	29
4.11.1. Linealidad.....	29
4.11.2. Intervalos de Confianza.....	29
4.11.3. Coeficiente de Regresión Lineal.....	30
4.11.4. Precisión	30
5. Resultados y Discusión	31
5.1. Morfología de las Raíces.....	31
5.2. Producción de Biomasa	32
5.2.1. Índices de Crecimiento.....	33
5.2.2. Curvas de Crecimiento de Raíces Cultivadas <i>in vitro</i> de <i>B. candida</i>	34
5.3. Cuantificación de Escopolamina por HPLC	37
5.4. Adición de L-Arginina como Precursor Exógeno	40
5.4.1. Biosíntesis de los Alcaloides del Tropano	42
5.5. Identificación y Cuantificación de Escopolamina	43
5.6. Validación del Método de Cuantificación de Escopolamina por HPLC	44
5.6.1 Curva de Calibración.....	44
5.6.1.1. Linealidad.....	44
5.6.1.2. Intervalos de Confianza de los Parámetros de Linealidad	45
5.6.2. Coeficiente de Regresión Lineal.....	46
5.6.3. Precisión	46
Conclusiones	48
Recomendaciones	49
Bibliografía	50
Anexo 1.....	55
Anexo 2.....	56
Anexo 3.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Algunos alcaloides del tropano.....	5
Figura 2 Flor de <i>Brugmansia candida</i>	7
Figura 3 Ruta biosintética propuesta para los alcaloides del tropano	13
Figura 4 Procedimiento básico para la extracción de alcaloides del tropano	15
Figura 5 Procedimiento de extracción de alcaloides del tropano	28
Figura 6 Morfología de las raíces cultivadas <i>in vitro</i> de <i>B. candida</i>	31
Figura 7 Curva de crecimiento promedio de las raíces <i>in vitro</i> de <i>B. candida</i> en base húmeda	35
Figura 8 Curva de crecimiento de las raíces <i>in vitro</i> de <i>B. candida</i> en base seca	35
Figura 9 Concentración promedio de escopolamina del control y los tres tratamientos en raíces normales de <i>B. candida</i>	38
Figura 10 Masa neta de escopolamina en el control y los tres ensayos en raíces normales <i>in vitro</i> de <i>B. candida</i> elicidadas con L-Arginina ..	39
Figura 11 Ruta biosintética de la putrescina.....	42
Figura 12 Reporte cromatográfico de la cuantificación de escopolamina en raíces normales <i>in vitro</i> elicidadas con L-Arginina a 1000 mg/L ...	44
Figura 13 Curva de calibración de la escopolamina hecha en HPLC	45
Figura 14 Diagrama de flujo para preparar 1.0 L de medio de cultivo SH.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Diversidad estructural de los MS que actúan como defensa en las plantas	2
Tabla 2 Clasificación de los alcaloides dependiendo del compuesto de origen en la biosíntesis.....	8
Tabla 3 Calistegeninas encontrados en plantas de la familia Solanaceae	12
Tabla 4 Constantes y propiedades físicas de algunos alcaloides del tropano.....	16
Tabla 5 Condiciones cromatográficas para la cuantificación de alcaloides del tropano por HPLC	17
Tabla 6 Comparación de condiciones de HPLC para la cuantificación de alcaloides del tropano.....	29
Tabla 7 Peso de las raíces cultivadas <i>in vitro</i> de <i>B. candida</i>	32
Tabla 8 Índices de crecimiento (IC) de las raíces de <i>B. candida</i> tratadas con L-Arginina	33
Tabla 9 Modelo de crecimiento de las raíces cultivadas <i>in vitro</i> de <i>B. candida</i>	36
Tabla 10 Concentración de escopolamina en el control y los tres tratamiento	37
Tabla 11 Precisión del método analítico y sus sistemas.....	46
Tabla 12 Preparación del medio de cultivo Schenk and Hildebrand (SH)(1972)	55
Tabla 13 Preparación de vitaminas para el medio SH.....	55

RESUMEN

Diferentes especies de la familia Solanaceae (*Datura*, *Hyoscyamus*, *Brugmansia*, etc) son estudiadas por la presencia de alcaloides del tropano, los cuales actúan sobre el sistema nervioso central (SNC), especialmente la escopolamina e hiosciamina, por lo que son de gran importancia farmacéutica, al servir en el tratamiento de múltiples enfermedades y como materia prima para la elaboración de medicamentos taxol y cantotesina.

Esta investigación se realizó con raíces normales de *Brugmansia candida* obtenidas y mantenidas en condiciones *in vitro*, que fueron elicitadas con L-Arginina con el objetivo de evaluar su efecto como precursor en la producción de escopolamina. Las muestras fueron procesadas y la escopolamina fue identificada y cuantificada por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) a partir de cada uno de los extractos crudos alcaloidales obtenidos.

Cada conjunto de raíces se desengrasó y se extrajo por 3 horas en soxhlet. Después, los extractos crudos se reconstituyeron en 1 mL de metanol grado HPLC para la determinación posterior de escopolamina por la técnica de HPLC, que se efectuó por el método de estándar externo.

De los experimentos del control y los tres tratamientos realizados a concentraciones de 10, 100 y 1000 mg/L de L-Arginina en el medio de cultivo de Schenk y Hilderandt, el tratamiento 3 (1000 mg/L de L-Arginina) presentó la mayor concentración de escopolamina el día 15 con 10.134 mg/g de rendimiento y la mayor cantidad del mismo alcaloide en el día 10 con 0.2652 mg.

Palabras Clave: HPLC, cultivo *in vitro* de raíces, escopolamina, hiosciamina, L-Arginina, metabolitos secundarios, Solanaceae, tropano alcaloides.

ABSTRACT

Some species of the Solanaceae family (*Datura*, *Hyoscyamus*, *Brugmansia*, etc) has been investigated for presence of tropane alkaloids for possessing central nervous system (CNS) activities, mainly scopolamine and hyoscyamine, because they have well established use in medicine in treatment of sickness and they were pre-drug of medicaments.

This investigation use *in vitro* normal roots cultures of *Brugmansia candida* elicited with L-Arginine for scopolamine induction. Samples were treated and scopolamine was identified and quantificated by high performance liquid chromatography (HPLC) following the external standart method.

Roots were degreassed and after that was extracted in soxhlet equipment for 3 hours. The concentrated extracts were dissolved in a phosphate buffer at pH 6.0 to a volumen of 1.0 mL. After homogenization each simple was analysed by HPLC.

Treatment 3 of all (control and three treatments to 10, 100 and 1000 mg/L of L-Arginine in culture médium Schenk and Hildebrant (SH) (1972)) has better concentration of scopolamine the 15 day with 10.13 mg/g and the better mass of equal alkaloid the 10 day with 0.2652 mg.

Keywords: tropane alkaloids, HPLC, *in vitro* normal roots cultures, scopolamine, hyoscyamine, L-Arginine, secondary metabolites.

1. REVISIÓN DE LA LITERATURA

1.1. Metabolitos Secundarios

Los metabolitos secundarios (MS) están presentes en todas las plantas superiores, usualmente en una alta diversidad estructural (ver tabla 1). Como regla general, un grupo simple de MS son los dominantes en un taxón dado. La distribución de MS en una planta dada es compleja, cambia en un tejido u órgano de una manera específica y sus diferencias se pueden determinar en diferentes estados de desarrollo de la planta a nivel individual o colectivo; por ejemplo, los MS más potentes están presentes en órganos para la supervivencia y la reproducción. Los MS pueden estar en la planta en estado activo o en caso contrario, estos pueden biosintetizarse mediante inducción por heridas o infecciones (fitoalexinas) (Wink, 2003).

Una planta al ser un organismo sésil no puede correr cuando es atacado por caracoles, insectos o herbívoros vertebrados y no cuenta con un sistema inmune para defenderse cuando es atacado por bacterias, hongos o virus. Las diferentes adaptaciones permiten explicar la existencia y diversidad de los MS; por esta razón, se acepta que desde los comienzos de la evolución de las Angiospermas hace cerca de 140 millones de años, los herbívoros y microbios siempre han estado presentes en la naturaleza y las plantas han desarrollado estrategias de supervivencia contra ellos (Wink, 2003).

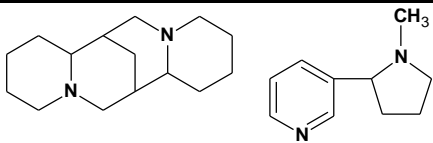
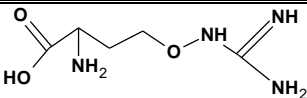
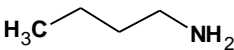
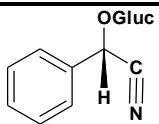
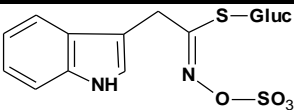
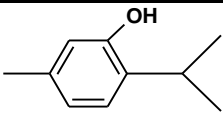
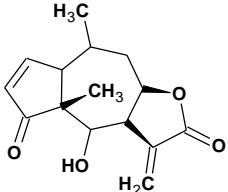
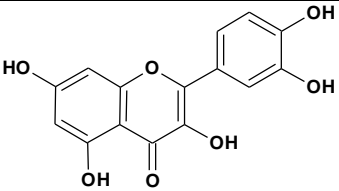
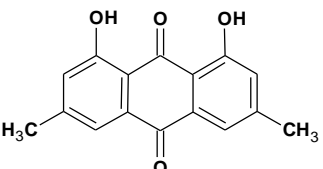
En común con otros organismos sésiles, las plantas también han implementado defensas químicas para rechazar, inhibir o destruir a sus enemigos. Incluso algunos insectos, frecuentemente coloreados, producen sus propias toxinas o las toman de plantas huéspedes para su propia defensa. Existe gran evidencia experimental que apoya el punto de vista de que muchos MS tales como alcaloides, glucósidos cianogénicos, glucosinalatos, terpenos, saponinas, taninos, antraquinonas y poliacetilenos son sustancias aleloquímicas. Estos grupos de compuestos fitoquímicos representan adaptaciones de las plantas que han diversificado por selección natural durante la evolución, con el fin de protegerse contra virus, bacterias, hongos, plantas competitivas y sobre todo contra herbívoros (Wink, 2003).

De acuerdo a Schulz y Baranska, (2007) los MS pueden ser de los siguientes tipos:

- Compuestos fenólicos, comprenden los fenilpropanos y los flavonoides. Los flavonoides se clasifican a su vez en flavonas, flavonoles, flavanonas y antocianinas, chalconas y auronas.
- Terpenoides, son de fórmula general $(C_5H_8)_n$ y se clasifican en hemiterpenos (C_5H_8), monoterpenos ($C_{10}H_{16}$), sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$), diterpenos ($C_{20}H_{32}$), triterpenos ($C_{30}H_{48}$), tetraterpenos ($C_{40}H_{64}$) y politerpenos $(C_5H_8)_n$.
- Alcaloides, los cuales se dividen en alcaloides verdaderos, protoalcaloides, pseudoalcaloides y alcaloides imperfectos (Arango, 2002).
- Poliacetileno.

- Nitrilos ($RC\equiv N$), glucósidos cianogénicos que bajo hidrólisis libera cianuro de hidrogeno (HCN).

Tabla 1 Diversidad estructural de los MS que actúan como defensa en las plantas (Wink, 2003).

Metabolitos Secundarios	Número de Productos Secundarios	Ejemplos
Con nitrógeno		
1. Alcaloides	12,000	
2. Aminoácidos no-protéicos	700	
3. Aminas	100	
4. Glicósidos Cianogénicos	60	
5. Glucosinolatos	100	
Sin nitrógeno		
6. Monoterpenos	2,500	
7. Sesquiterpenos	5,000	
8. Flavonoides	4,000	
9. Policétidos	750	

En algunas ocasiones las actividades de defensa y atracción son presentadas por el mismo grupo de compuestos; por ejemplo, las antocianinas y los

monoterpenos puede servir de atrayentes en las flores para los insectos, pero algunas veces actúan como insecticidas y agentes antimicrobianos (Wink, 2003).

Las funciones presentadas, como agentes de defensa química y compuestos implicados en la polinización, son típicas y no contradicen el papel principal de los MS. Si una determinada propiedad puede presentar funciones múltiples valiosas (la producción y almacenamiento de MS es energéticamente costoso), es altamente probable que esta sea mantenida por selección natural en el tiempo, sin importar que dicha propiedad tenga requerimientos energéticos altos (Wink, 1999).

1.1.1. Propiedades Aleloquímicas de los Metabolitos Secundarios (MS)

Los aleloquímicos son MS que la planta utiliza para defenderse; por lo tanto, son sustancias mediadoras de la actividad alelopática (Schmidt y Evans, 1990).

Los MS planos (regularmente sistemas tri- o tetra-cíclicos) y lipofílicos se pueden intercalar en el ADN; por ejemplo, los alcaloides (emetina, sanguinarina, berberina) o quinonas y varias furanocoumarinas; otros MS con grupos funcionales reactivos pueden alcalinizar el ADN produciendo perturbación en la duplicación y transcripción o su cambio en estructura; por ejemplo, alcaloides pirrolidínicos (cicasina). También MS tales como quinonas, furanocoumarinas, tiofenos, poliacetilenos y varias lactonas sesquiterpénicas presentan sustituyentes químicamente reactivos que pueden formar enlaces covalentes con las proteínas y consecuentemente alterar su bioactividad (Wink, 2003).

Los MS que están ampliamente distribuidos en el reino vegetal (fenoles, terpenoides y saponinas) pueden afectar blancos moleculares en animales y microbios de una manera más específica. Los taninos tienen un número de grupos que pueden formar múltiples enlaces iónicos y de hidrógeno con todo tipo de proteínas (enzimas, transportadores, canales iónicos, receptores, etc.) cambiando su conformación una vez formado el complejo tanino-proteína, perdiendo su actividad y función original. Los Terpenos lipofílicos (mono y sesquiterpenos volátiles, etc.) son solubles en biomembranas; a altas concentraciones, perturban el entorno de las proteínas y de esta manera modifican su conformación y bioactividad (Wink, 2003).

Las saponinas son compuestos anfipáticos que interactúan fuertemente con biomembranas. Ellas pueden formar poros en las mismas facilitando la pérdida del contenido celular; la consecuencia general es un amplio efecto citotóxico o antimicrobiano. Una perturbación en la permeabilidad de la membrana puede ser causada también por mono, sesqui y diterpenos lipofílicos si las membranas son expuestas a altas concentraciones de ellos (Wink, 2003).

Los MS frecuentemente tienen más de un grupo funcional, por consiguiente presentan a menudo funciones y bioactividades múltiples. Además, debido a que los MS están presentes en mezclas complejas que contienen varios tipos

estructurales, se garantiza una estrategia para interferir con más de un blanco molecular en herbívoros y microbios, logrando de esta manera proteger la planta que los produce contra una amplia variedad de enemigos. Aún si la interacción de un MS es inespecífica y débil, la suma de todas las interacciones produce un efecto sustancial que puede ser aditivo, exponencial o sinérgico entre los diferentes componentes de la mezcla (Wink, 2003).

En conclusión, la evidencia experimental y circunstancial soporta la suposición de que muchos de los MS más importantes, son vitales para la supervivencia de la planta que los produce. Los MS deben por consiguiente, ser reconocidos como parte de las propiedades adaptativas que han sido formadas y modificadas por selección natural durante la evolución de las plantas. Esta conclusión debe tener implicaciones para el uso de los MS considerados como marcadores taxonómicos (Wink, 2003).

1.2. Familia Solanaceae

Las plantas de la familia Solanaceae son de importancia económica en los sectores agrícola y farmacéutico. Esta familia comprende alrededor de 96 géneros y 3000 especies que muestran una distribución cosmopolita, con su centro de diversidad taxonómica en América del Sur (Harborne y Baxter, 1993).

Las plantas de la familia Solanaceae producen una amplia variedad de MS tales como tropano, piridina, alcaloides esteroidales, ecdiesteroides, sesquiterpenos, witanolidos, diterpenos y antraquinonas. En la familia, ciertos grupos y géneros están bien caracterizados por la presencia o ausencia de estos MS. Por consiguiente, la distribución de MS ha sido usada para proponer una clasificación de la familia Solanaceae (Harborne y Baxter, 1993).

Los alcaloides del tropano, tales como hiosciamina, escopolamina (ver figura 1) y otros ésteres de la tropina, constituye uno de los grupos más distintivos de MS de la familia Solanaceae. Muchas plantas que contienen estos alcaloides han sido utilizadas desde tiempos inmemoriales por sus propiedades medicinales, alucinógenas y venenosas (Wink, 2003).

Los alcaloides del tropano también han sido reportados en plantas de otras familias diferentes a la Solanaceae, tales como: Brassicaceae, Convolvulaceae, Erythroxylaceae, Euphorbiaceae, Proteaceae y Rhizophoraceae (Griffin y Lin, 2000).

En la familia Solanaceae los alcaloides del tropano fueron aislados en las subfamilias Schizanthoideae, Solanoideae y Nicotianoideae. Estos alcaloides son especialmente abundantes en ciertos grupos como Datureae, Hyoscyameae y Mandragoreae y especialmente en los géneros *Datura*, *Brugmansia*, *Hyoscyamus*, *Atropa*, *Scopolia*, *Anisodus*, *Atropanthe*, *Physochlaina*, *Mandragora*, *Anthotroche*, *Cyphantera* y *Duboisia*. En Physaleae, Solaneae y Solandaeae solamente un número limitado de taxones produce alcaloides del tropano, los cuales están completamente ausentes en

otros grupos y subfamilias; por ejemplo, Pentanioideae y Cestroideae (Wink, 2003).

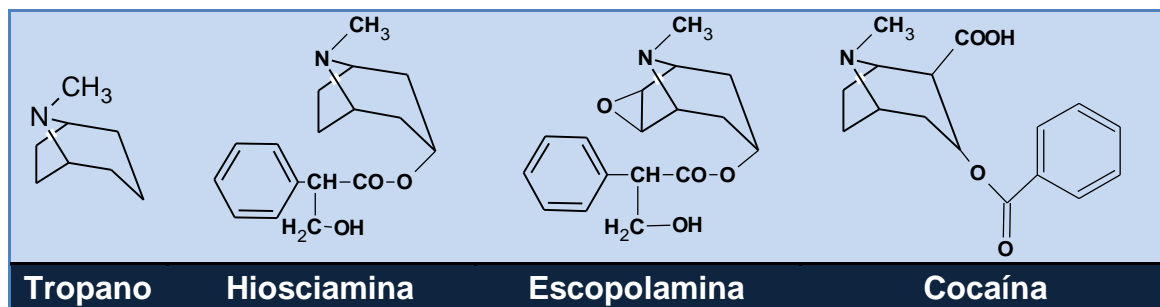


Figura 1 Algunos alcaloides del tropano

Los taxones que producen alcaloides del tropano no se agrupan en una sola línea monofilética, sino que están aparentemente inconexos (Wink, 2003). Entre todos los miembros de los grupos Datureae, Hyoscyameae y Mandragoreae se producen alcaloides del tropano. En otros grupos, los alcaloides del tropano están presentes solamente en unos pocos miembros, formándose de esta manera un rasgo distintivo.

Por otro lado, los alcaloides esteroidales son MS típicos de las familias Solanaceae, Buxaceae, Liliacea y Apocynaceae. Estos alcaloides son característicos de los géneros *Solanum* y *Lycopersicon*. Una ocurrencia muy pequeña ha sido reportada en los géneros *Lycianthes*, *Cyphomandra* y *Cestrum* (Harborne y Baxter, 1993).

Por su parte los alcaloides de la piridina, como la nicotina, son típicos y los mayores aleloquímicos del género *Nicotiana*, los cuales están presentes en todos sus miembros, constituye una característica derivada y consistente para éste grupo. La ocurrencia aislada de nicotina, generalmente como un componente minoritario, ha sido reportada para unos pocos géneros de la subfamilia Solanoideae los cuales no están estrechamente relacionados con los géneros de la subfamilia Nicotianoideae. Aparentemente la sola distribución de la nicotina no representa un buen marcador taxonómico para taxones que no están relacionados (Wink, 2003).

Los witanolidos son un grupo de lactonas esteroidales con propiedades insecticidas fuertes que parecen estar restringidos a la familia Solanaceae; además son típicos para géneros del grupo Physaleae, aunque con ocurrencias aisladas reportadas para *Brugmansia* (grupo Datureae), *Hyoscyamus* (grupo Hyoscyameae), *Lycium* (grupo Lycieae), *Jaborosa* (grupo Jaboroseae), *Nicandra* (grupo Nicandreaea) y *Browallia* (grupo Browallieae) (Hegnauer, 1990).

Al considerar la ocurrencia de los MS más abundantes de la familia Solanaceae se hace visible un modelo general. La distribución de alcaloides tropánicos, alcaloides esteroidales, nicotínicos y witanolidos está muy a menudo excluida mutuamente aunque estén distribuidos en grupos específicos. Estos productos

naturales son activos contra herbívoros y sirven como compuestos de defensa química de las plantas que los producen; por consiguiente, dichos compuestos constituyen una propiedad importante que representa las características adaptativas, pero usualmente con valor limitado como marcadores taxonómicos (Schimmer y Wink, 1999).

De acuerdo a Griffin y Lin, (2000) la familia de Solanaceae tiene la siguiente clasificación taxonómica:

- Reino: Plantae
- División: Sphonogama
- Clase: Dicotiledónea
- Subclase: Sympetaleae
- Suborden. Solalineae
- Familia. Solanaceae

1.3. El Género *Brugmansia*

Plantas del género *Brugmansia* se sabe que eran utilizadas desde tiempos remotos como alucinógenas. Este empleo quizá provenga del conocimiento que se tenían de las *Daturas* y que fue traído a tierras americanas por los protoindígenas mongoles a finales del período Paleolítico y durante el Mesolítico. A medida que los primeros pobladores del continente americano migraron hacia el sur, encontraron otras especies de *Datura*, especialmente en México donde fueron utilizadas por los médicos-sacerdotes-brujos con fines terapéuticos y ceremoniales. Durante la migración de estas tribus hacia el sur del continente americano, al llegar a los Andes reconocieron el parecido de las *Brugmansias* con las *Daturas* y las utilizaron de manera similar (Arteaga et al., 1993).

En Colombia las *Brugmansias* fueron usadas especialmente en las regiones Andinas y Amazónicas, como medicinas y alucinógenas. Es bien sabido que los Chibchas usaron *Brugmansia sanguinea* en ceremonias religiosas en el templo del sol para producir un estado de sueño y de inconsciencia a las esposas y esclavos de los guerreros que morían, con el fin de enterrarlos vivos con ellos (Arteaga et al., 1993).

Actualmente se conoce con el nombre de “Burundanga” un extracto obtenido de especies de *Brugmansia* que crecen silvestres en la sabana de Bogotá, utilizando como disolventes gasolina y que contienen principalmente escopolamina. En ocasiones se utiliza el fruto seco y pulverizado adicionando a la comida o bebida con fines delictivos (Arteaga et al., 1993).

B. candida es un miembro de la familia Solanaceae que produce alcaloides del tropano, drogas que son extensivamente usadas en medicina, especialmente la escopolamina y la hiosciamina. Estos alcaloides son empleados en el tratamiento de espasmos gastrointestinales y particularmente en el caso de la escopolamina como medicamento preoperatorio y en la prevención de enfermedades (Pitta-Alvarez y Giulietti, 1995).

B. candida es un híbrido natural entre *B. aurea* y *B. versicolor* la cual se encuentra en territorio suramericano y es usada por diferentes tribus indígenas con fines religiosos y por chamanes con diferentes propósitos (ver figura 2) (Giulietti et al., 1993).



Figura 2 Flor de *Brugmansia candida*

1.4. Alcaloides

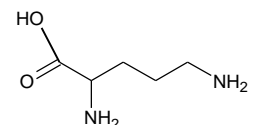
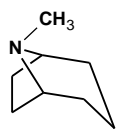
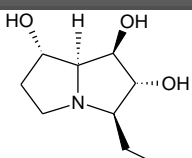
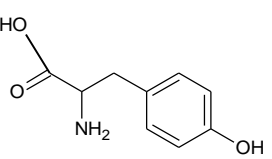
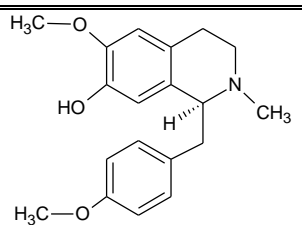
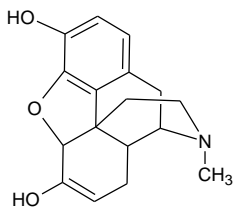
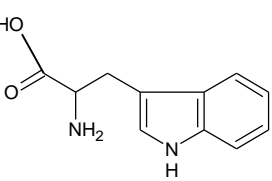
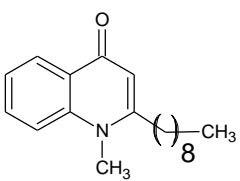

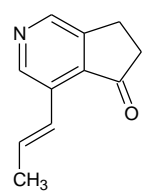
La era moderna de los productos naturales, en términos de elucidación estructural, emerge hace 150 años, a mediados del siglo XIX, al proponer las estructuras de los alcaloides de plantas. Los alcaloides fueron el mayor foco de investigación de la química orgánica en ese momento y se debieron desarrollar métodos de extracción y separación que dieran como resultado muestras analíticamente puras. Por otra parte, investigadores de química orgánica de Alemania e Inglaterra trabajaron en la síntesis de estos productos naturales (Humphrey y O'Hogan, 2001).

Los alcaloides son un grupo de MS difíciles de definir por su diversidad estructural, pero a pesar de esto se consideran “compuestos orgánicos heterocíclicos que contienen nitrógeno”. La presencia de un átomo de nitrógeno marca el carácter básico de un alcaloide, como lo sugiere su nombre (Pfister et al., 2001); por lo tanto, son capaces de formar sales solubles; sin embargo, en las vacuolas de las plantas, pueden encontrarse en estado libre, como sal o como un N-óxido, formando depósitos frecuentemente neutralizados con ácidos fenólicos en forma de ácidos clorogénicos o cafeínicos (Julsing et al., 2006). Los alcaloides también se pueden biosintetizarse en microorganismos y organismos marinos, siguiendo rutas complejas (Deborah y Bruce, 2002).

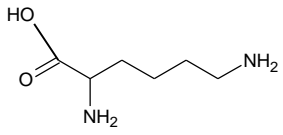
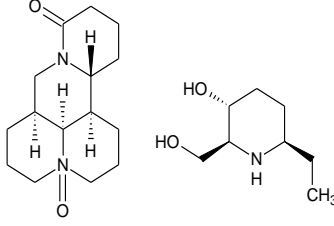
Los alcaloides pueden ser clasificados en términos de su actividad biológica, su estructura química, o de una manera más aceptable en la actualidad, por su origen biosintético. Basado en lo anterior son divididos comúnmente en grupos superiores dependiendo de la piridina o aminoácido de origen en la biosíntesis, como se muestra en la tabla 2 (Julsing et al., 2006). Unos pocos son derivados

de las bases púricas y pirimidicas y no de aminoácidos (Schulz y Baranska, 2007).

Tabla 2 Clasificación de los alcaloides dependiendo del compuesto de origen en la biosíntesis (Julsing et al., 2006).

Compuesto de Origen	Estructura del Compuesto de Origen	Grupo de Alcaloides (Ejemplos)	Referencia
Ornitina		 Tropano  Pirrolizidínicos	Izquierdo et al., (2008)
Tirosina		 Benzilisoquinolínicos  Isoquinoléicos	Liscombe y Facchini, (2008)
Triptófano		 Quinoléicos	Luo et al., (2005)
Piridina		 Piridínicos	Catozzi et al., (2008)

Continuación de la tabla 2

Lisina			Yin et al., (2008); Fuhshuko y Mori, (2007)
		Quinolizidínicos Piperidínicos	

Los alcaloides también se clasifican por la estructura del anillo heterocíclico, y la ubicación del átomo de nitrógeno en el anillo, de la cual resultan siete categorías de alcaloides: de la pirrolidina, quinolizidina, indolizidina, diterpenoides, piperidina, piridina y esteroidales. La estructura del anillo es importante porque especifica las características que son responsables de la actividad biológica de los compuestos individuales (Pfister et al., 2001).

Los alcaloides son por lo general de bajo peso molecular, los cuales se encuentran en cerca del 20% de todas las especies de plantas, muchas de ellas pertenecientes a las dicotiledóneas (Pfister et al., 2001). Esta diversidad de grupos implica muchos metabolitos bioactivos de los aproximadamente 12,000 (ver la tabla 1) compuestos alcaloides conocidos actualmente (Yazaki, 2006); esto los hace un grupo fascinante y extenso de MS. Algunos alcaloides poseen una estructura muy similar a la de neurotransmisores tales como la acetilcolina, dopamina y serotonina. Esta similaridad estructural explica parcialmente la actividad de algunos alcaloides sobre el Sistema Nervioso Central (SNC) (Pfister et al., 2001).

Muchos alcaloides presentan importantes actividades biológicas y farmacológicas, algunos poseen actividades más potentes, por lo que juegan un papel importante en la preparación de medicamentos ampliamente usados en el tratamiento de diversas enfermedades. Se puede incluir el famoso alcaloide citotóxico bisindolina, el diterpenoide taxol, el analgésico morfina, los espasmolíticos tubocurarina y papaverina, los agentes vasodilatadores vincamina y ajmalicina, la emetina con su actividad emética, el antitusivo codeína, la galantamina usada en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y los alcaloides antiarrítmicos funuidina y ajmalina (Stöckigt et al., 2002).

El uso de los alcaloides en medicina ha generado un mercado mundial de \$ 4 billones de dólares anuales (Julsing et al., 2006) debido a efectos como:

- Midriasis
- Vaso constricción de los vasos capilares
- Relajamiento del tubo digestivo
- Una acción sedativa del SNC con efecto hipnótico
- Agentes anticolinérgicos

Muchos efectos de los alcaloides son perjudiciales, un ejemplo de ello lo constituyen una variedad de plantas que contienen alcaloides (de la familia Liliaceae de las monocotiledóneas), que son más venenosas para el ganado, que cualquier otra clase de plantas (Pfister et al., 2001). Otro ejemplo, lo constituyen las plantas pertenecientes al género *Datura* de la familia Solanaceae, que son a veces perjudiciales, interfiriendo con la producción de más de 40 tipos de cultivos en cerca de 100 países. En los Estados Unidos estas plantas son un serio problema para los cultivos de soya (Deng, 2005).

Específicamente, *Datura stramonium* (Jimsonweed) está incluida entre las diez plantas que más afectan negativamente el costo de producción de las cosechas. *D. stramonium* es también una de las plantas más narcóticas y venenosas del mundo. Todas las partes anatómicas de esta especie pueden ser muy venenosas para animales y humanos. La toxicidad de esta planta se debe a la presencia de los alcaloides del tropano (atropina, hiosciamina y escopolamina); los cuales contienen un átomo de nitrógeno metilado (N-CH₃, ver figura 1) y son drogas anticolinérgicas (Deng, 2005).

1.4.1 Alcaloides del Tropano

Los alcaloides del tropano tales como la hiosciamina y escopolamina, encontrados inicialmente en Henbane (*Hyoscyamus niger*, Solanaceae) y Mandrágora (*Mandragora officinarum*, Solanaceae) respectivamente, fueron usados en la edad media como alucinógenos. Estos alcaloides presentan como característica una fuerte acción midriática. La atropina causa la dilatación de las pupilas a una concentración de 1 en 130.000 partes de agua por lo que es usada en oftalmología. Durante el renacimiento las jóvenes se aplicaban gotas de extracto de belladona (*Atropa belladonna*) en sus ojos para hacerse más atractivas (Humphrey y O'Hogan, 2001).

La cocaína (ver figura 1) fue aislada de las hojas de *Erythroxylon coca*. Esta planta fue conocida por sus propiedades anestésicas y estimulantes del SNC y por mejorar la resistencia física. Estas propiedades popularizaron ampliamente la droga y fue utilizada en Europa en varios tratamientos médicos, antes que se descubrieran las propiedades adictivas de este alcaloide (Humphrey y O'Hogan, 2001).

El número de alcaloides del tropano conocidos provenientes de fuentes naturales excede los 200, han sido aislados de muchas familias diferentes de plantas (Solanaceae, Erythroxylaceae, Convolvulaceae, Proteaceae, Rhizophoraceae, Brassicaceae y Euphorbiaceae) y comprenden los tropano mono, di y triésteres carboxilados y benzoilados. Muchos alcaloides del tropano tienen varios nombres en común; por ejemplo, Hioscina (escopolamina) o 6β-hidroxihiosciamina (anisodamina). La mezcla racémica de (R, S)-hiosciamina recibe por nombre, atropina. Esto genera complicaciones en los reportes de evaluación sobre análisis de alcaloides del tropano (Dräger, 2002).

Muchos alcaloides del tropano son compuestos quirales. Frecuentemente la quiralidad es introducida por el ácido trópico o por la presencia de ecgonina. Solamente la forma R del ácido trópico se encuentra en forma natural en los alcaloides del tropano; sin embargo, en la extracción con soluciones básicas ocurre racemización (Dräger, 2002).

Los alcaloides del tropano han sido establecidos como drogas para tratamientos médicos, desde hace muchos años. Estos alcaloides del tropano son obtenidos principalmente de la familia Solanaceae, en especies como *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus niger* y *Datura stramonium* (Dräger, 2006).

Después que los alcaloides fueron detectados como constituyentes químicos de las plantas y llamados como tal, muchos esfuerzos por proveer estos compuestos puros para usos medicinales han sido realizados. La “atropina” fue definida como una mezcla racémica del enantiómero (S)-hiosciamina, el cual se encuentra naturalmente en las plantas y posee actividad farmacológica alta, en contraste con su enantiómero (R)-hiosciamina, el cual se forma durante el proceso extractivo y es farmacológicamente inactivo. La escopolamina fue detectada de manera individual en la especie *Scopolia atropoides*, tiempo después se comprobó que era idéntica al compuesto llamado hioscina que fue separado de la hiosciamina en el extracto de *Hyoscyamus muticos* (Dräger, 2006).

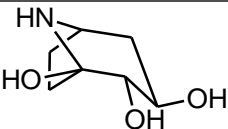
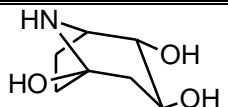
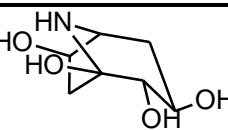
Hoy en día los alcaloides del tropano de la familia Solanaceae son extraídos de los cultivos de *Duboisia* en su mayor parte híbridos de *D. leichhardtii* y *D. myoporoides*, nativas de Australia. Las especies del género *Duboisia* crecen como árboles perennes y los híbridos cultivados pueden contener más del 4% de alcaloides (base seca) en sus hojas, siendo la escopolamina el alcaloide mayoritario. El consumo mundial de la escopolamina dobla varias veces el consumo de la hiosciamina; esto se debe, a que la escopolamina es usada principalmente como materia prima para la semisíntesis de varias drogas importantes (Dräger, 2006).

La atropina se aplica como inyección en intervenciones quirúrgicas, también se utiliza para combatir los cólicos en el sistema digestivo y como antídoto contra intoxicación con insecticidas organofosforados. La escopolamina es usada contra enfermedades, en forma de una cinta adhesiva fijada detrás de la oreja, desde la cual se libera por varias horas. La escopolamina en la forma de N-butil-hidrobromida se usa contra espasmos de la vejiga, del intestino o de la vesícula biliar por aplicación oral. La escopolamina tiene la ventaja de no tener efectos colaterales en el SNC, por lo que sus derivados son usados como drogas anticolinérgicas que son inhaladas para prevenir el asma. Investigaciones recientes sobre derivados del tropano han permitido aislar compuestos nuevos, como el triotropiumbromida, que es un derivado semisintético de la escopolamina, el cual es utilizado específicamente para el tratamiento de la enfermedad de obstrucción pulmonar crónica (Dräger, 2006).

En los últimos 15 años, se ha descubierto un nuevo grupo de alcaloides nor-tropánicos en la familia Solanaceae conocidos como calistegeninas (ver tabla 3), los cuales poseen de tres a cinco grupos hidroxilo en varias posiciones que

los hace altamente solubles en agua. Basados en el anillo bicíclico nortropano, se asume que las calistegeninas se forman a partir de las rutas biosintéticas de los alcaloides del tropano; además, estos compuestos han sido encontrados en extractos de alcaloides del tropano de plantas pertenecientes a la familia Solanaceae. Procedimientos de extracción y purificación específicos, deben ser desarrollados para el análisis de estos alcaloides tropánicos polihidroxilados (Dräger, 2006).

Tabla 3 Calistegeninas encontrados en plantas de la familia Solanaceae

Nombre	Estructura	Referencia
Calistegenina A ₃		Dräger, 2006
Calistegenina A ₅		
Calistegenina B ₁		

1.4.1.1. Biosíntesis de los Alcaloides del Tropano

La diversidad estructural de los alcaloides ha forzado a concentrarse en la elucidación de las rutas biosintéticas durante las últimas décadas. En la actualidad existen los primeros ejemplos de enzimas que catalizan los múltiples pasos de las rutas biosintéticas. De esta manera, se han realizado estudios exitosos en genética molecular sobre formación de alcaloides, incluyendo los primeros ejemplos de expresiones heterólogas de las enzimas que catalizan el metabolismo de los alcaloides (Stöckigt et al., 2002).

Los efectos ya mencionados de los alcaloides del tropano como anticolinérgicos, antieméticos, parasimpatolíticos y agentes anestésicos han generado un interés considerable desde hace algún tiempo sobre las rutas biosintéticas que siguen los alcaloides del tropano. En particular, ha sido demostrado que el lugar de la biosíntesis de estos alcaloides es la raíz, de donde son translocados a las partes aéreas de la planta (Jordan et al., 2006).

El conocimiento actual de las rutas biosintéticas de los alcaloides del tropano, se resumen en la figura 3. La estructura del tropano de estos alcaloides permite inferir que el anillo pirrolidina proviene del aminoácido ornitina o arginina a través de la acción de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) o arginina descarboxilasa (ADC), respectivamente. Ornitina y arginina son precursoras de las poliaminas: putrescina, espermidina y espermina (Sato et al., 2001). Las poliaminas juegan un papel crítico en el desarrollo vegetal, regulando la división

celular en las plantas. Aunque tanto ornitina como arginina, pueden ser metabolizadas a putrescina, evidencias recientes sugieren que la arginina participa en mayor proporción en la formación de putrescina en la ruta biosintética de los alcaloides del tropano (Deng, 2005).

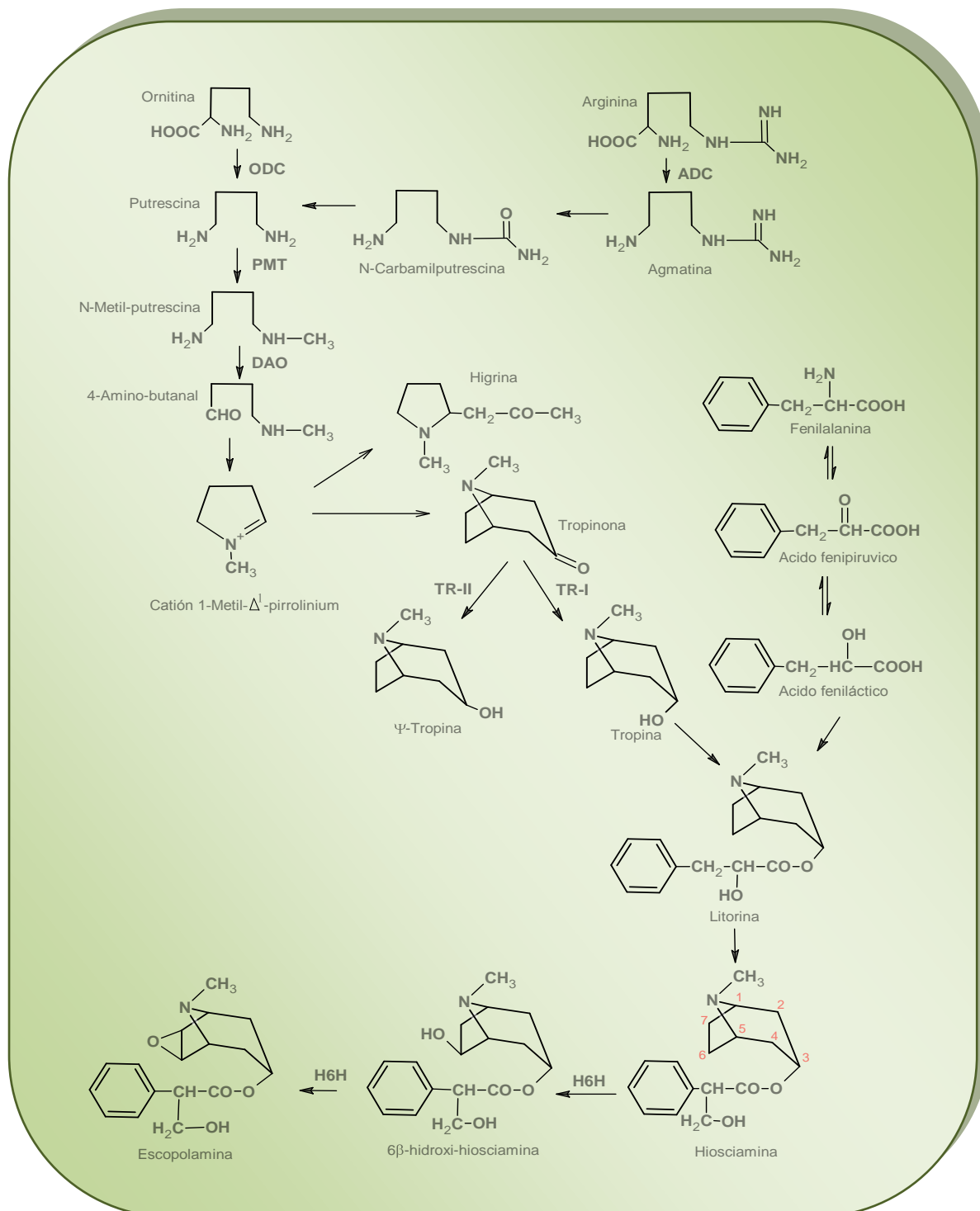


Figura 3 Ruta biosintética propuesta para los alcaloides del tropano. **ADC**, arginina descarboxilasa; **ODC**, ornitina descarboxilasa; **PMT**, putrescina N-metiltransferasa; **DAO**, diamina oxidasa; **TR**, tropinona reductasa; y **H6H**, hiosciamina 6β-hidroxilasa (Deng, 2005)

La putrescina N-metiltransferasa (PMT) es la primera enzima que maneja el flujo de nitrógeno en una etapa temprana de la biosíntesis. Subsecuentemente la N-metilputrescina es deaminada por la diamina oxidasa (DAO) a 4-aminobutanal, el cual sufre ciclación espontánea para formar el catión reactivo N-metil- Δ^1 -pirrolinium (Deng, 2005).

El catión N-metil- Δ^1 -pirrolinium se condensa con el ácido acetoacético para producir higrina como precursor del anillo del tropano. La tropinona es el primer intermediario con anillo del tropano. La litorina es producida por la condensación de la tropina y el intermediario fenilalanina, del cual se deriva el ácido trópico. El reordenamiento del esqueleto carbonado de la litorina a escopolamina es estimulado por la S-adenosilmetiona. La enzima hiosciamina 6 β -hidroxilasa (H6H) es responsable por la conversión de hiosciamina a 6 β -hidroxihiosciamina y la subsiguiente epoxidación a escopolamina por medio de la remoción del hidrógeno de la posición 7 β (Deng, 2005).

1.4.1.2. Extracción de Alcaloides del Tropano

Para muchos alcaloides el procedimiento de extracción (ver figura 4) está basado en la solubilidad de la sal de los alcaloides en comparación de las bases libres. Todos los alcaloides del tropano, excepto apoatropina y cocaína, se solubilizan en agua fácilmente a pH bajo, lo cual permite una extracción selectiva con agua acidulada. Un extracto acuoso ácido debe ser basificado para obtener los alcaloides en forma de bases libres para su extracción con un solvente orgánico no miscible en agua.

El uso excesivo de álcali es perjudicial en los procesos extractivos de los alcaloides con grupos funcionales éster (hiosciamina, escopolamina y los ésteres acetil) puesto que pueden ser hidrolizados y modificados estructuralmente. Si se utiliza la extracción líquido-líquido, se debe extraer rápidamente de la muestra basificada o alcalinizar moderadamente la solución con carbonato de sodio o amoníaco (Dräger, 2002). En la figura 4 se presenta un esquema básico general de extracción de alcaloides del tropano (Jordan et al., 2006).

1.4.1.3. Análisis de Alcaloides del Tropano

1.4.1.3.1. Cuantificación de Alcaloides del Tropano por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)

Las propiedades químicas de compuestos individuales, tales como la constante de disociación (ver tabla 4), estereoquímica y datos espectroscópicos, son características útiles para el desarrollo de separaciones cromatográficas (Dräger, 2002).

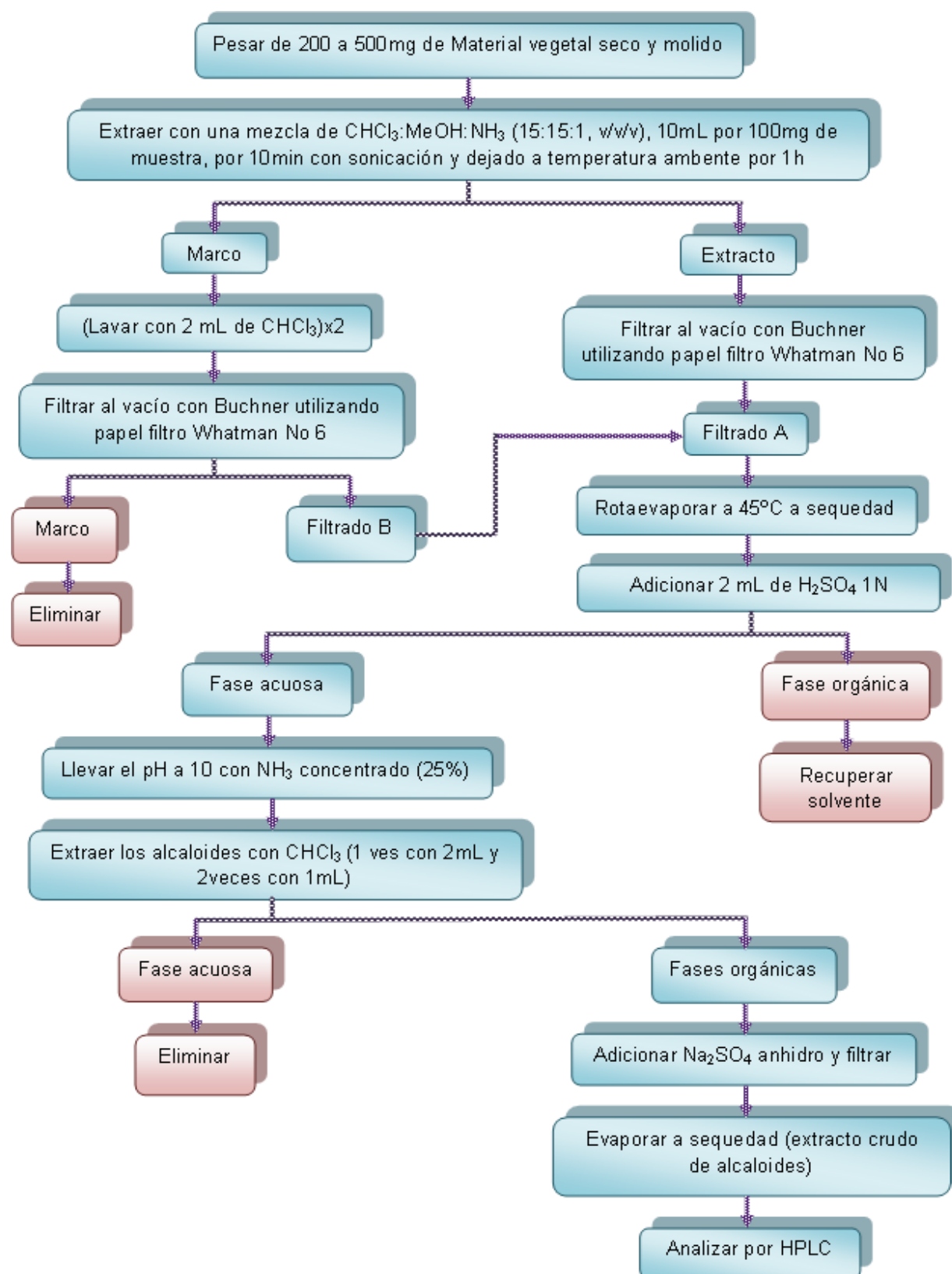


Figura 4 Procedimiento básico para la extracción de alcaloides del tropano (Jordan et al., 2006)

Tabla 4 Constantes y propiedades físicas de algunos alcaloides del tropano (Dräger, 2002)

Alcaloide	Masa molecular	Constante de disociación	Solubilidad ¹	Punto de fusión (°C)	λ max
Hiosciamina	289.37	pK _b 4.3	H ₂ O, ms pH 4, s pH 8, mps pH 10, EtOH y CHCl ₃ , ms	108.5	258nm (ác. diluido)
(R)-Litorina	289.37	pK _b 4.0 pK _a 12.9	H ₂ O, ms pH 4, s pH 8, mps pH 10, EtOH y CHCl ₃ , MS	————	————
(S)-Escopolamina= Hioscina	303.35	pK _b 6.4	H ₂ O, ms pH 4, ps pH 7, mps pH 10, EtOH, éter, CHCl ₃ ms	59 (monohidratada)	257nm (ác. diluido)
(S)-Escopolamina hidrobromada	384.30	pK _a 7.6	H ₂ O, EtOH ms	197 (trihidratada)	258nm (MeOH)
(2R,3S)-Cocaína	303.35	pK _b 5.4	CHCl ₃ , éter, EtOH ms, H ₂ O ps pH 4, mps pH 10	96-98	233nm (ác. diluido)
Tropina	141.21	pK _b 3.2	H ₂ O ms pH 10	63	————
Higrina	141.21	pK _b 4.2	H ₂ O ms pH 8, s pH 10	Líquido a temperatura ambiente	————
Tropinona	139.19	pK _b 5.1	H ₂ O ms pH 8, s pH 10, MeOH MS	42	————

¹ms, muy soluble > 1M; s, soluble, 0.1M > 1M; ps, soluble, 0.01M > 0.1M; mps, soluble, < 0.01M

El primer reporte sobre cuantificación de alcaloides del tropano a partir de muestras de plantas por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) fue publicada en 1985. Se empleó una columna de silica gel microparticulada (5 µm) y una fase móvil que consistía de tetrahidrofurano al 1% de amoníaco. Para la *Atropa belladonna* y *Datura stramonium* se determinaron los contenidos de escopolamina e hiosciamina en raíces, hojas y frutos; además, se evaluó el contenido de alcaloides de una variedad de hojas del género *Datura*. El interés en la biosíntesis de los alcaloides del tropano guió al desarrollo de métodos de HPLC sensibles. Algunas de estas condiciones se muestran en la tabla 5 (Dräger, 2002).

Plank et al., (1986) usaron para la separación de escopolamina e hiosciamina de las hojas de *Datura innoxia*, una columna de RP-18 (Fase reversa de octadecilsilano) (5 µm, 25 cm x 4 mm) usando como eluyente Buffer de fosfato (pH 7.25, fosfato de trietilamonio 0.2% con agua como solvente)-metanol

(40:60). La separación fue monitoreada a 204 nm y los alcaloides fueron determinados con un límite de detección de 1 µg/mL.

Tabla 5 Condiciones cromatográficas para la cuantificación de alcaloides del tropano por HPLC

Columna	Detector	Temperatura de la columna	Volumen de inyección	Flujo, Tiempo de análisis	Fase móvil	Referencia
RP-C18 150mmX2.1mm 5 µm	996 PDA, ZMD ¹	Desolvatación = 400°C Bloque de fuente = 120°C	10 µL	0.2 mL/min, 20 min	(CH ₃ CN-H ₂ O) 10%:90% H ₂ O+10mM en CH ₃ COONH ₄ , pH=10.5 ajustado con NH ₃ (25%) ²	Steenkamp et al., (2004)
C18 15cmX4.6mm 5 µm	UV, 210 nm	Ambiente	10 µL	0.8 mL/min, 10 min	Acetonitrilo-0.05 CH ₃ COOH	Theodoridis et al., (2003)
C18 125mmX4.6mm 5 µm	UV, 272 nm	Ambiente	20 µL	1 mL/min, 34 min	MeCN:Agua, 5:95, cambiados en un gradiente de elución cada 5 min hasa llegar a 100:0	Zanolari et al., (2003)
C18 250mmX4.6mm 5 µm	UV, 254 nm	Ambiente	20 µL	1 mL/min, 20 min	40% metanol(v/v) con 0.2%(v/v) de buffer de ácido fosfórico a pH 7.5 con trietilamina	Tiburcio et al., (1985)
C18 250mmX4.6mm 5 µm	UV, 215 nm	30°C	20 µL	1 mL/min, 20 min	Acetonitrilo:Buffer ³ 15:85	Gallego et al., (2003)

¹ZMD spray mass selective detector.

²10%, acetonitrilo; 90%, agua conteniendo 10 mM de acetato de amonio y pH ajustado a 10.5 con amoníaco (25%) seguido por un gradiente lineal hasta llegar a una solución de 80% de acetonitrilo y 20% de agua.

³Buffer de fosfato de potasio 50mM a pH 3.0 con ácido fosfórico.

1.4.1.3.2. Cromatografía de Gases

El método de cromatografía de gases (CG) es usado frecuentemente para el análisis de alcaloides del tropano (Mroczek et al., 2006) en cultivo de raíces transformadas y no transformadas de la familia Solanaceae que acumulan cantidades considerables de hiosciamina y escopolamina (Steenkamp, 2004). Principalmente se emplea la CG acoplada con espectroscopia de masas (EM) para separar e identificar los precursores marcados isotópicamente empleados para estudiar las rutas biosintéticas de los alcaloides en los cultivos de tejidos objeto de estudio (Dräger, 2002).

Para la CG se usan detectores de ionización de llama (FID), de fósforo-nitrógeno (NPD) y captura de electrones (ECD). Los detectores NPD tienen la mejor sensibilidad y selectividad para compuestos que tienen nitrógeno y

fósforo aunque puede presentar inconvenientes en la determinación de pureza de la muestra (Dräger, 2002).

El problema principal de la CG es la derivatización de la muestra lo cual es tedioso. Por esta razón el método de HPLC es la primera opción para el análisis de alcaloides del tropano (Mroczek et al., 2006).

1.4.1.3.3. Cromatografía de Capa Delgada

La cromatografía de capa delgada (CCD) se usa para evaluación preliminar del extracto de alcaloides (Molyneux et al., 2002). Las fases estacionarias utilizadas para la caracterización de alcaloides son sílica gel o alúmina (fase normal) (Molyneux et al., 2002) y se usan en fases móviles solventes como cloroformo (CHCl_3), acetona (CH_3COCH_3), acetato de etilo ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$) con alcoholes como metanol, propanol y butanol para ajustar la polaridad y dietilamina o amoníaco para definir las bandas (McCalley, 2002).

Una de las mayores ventajas de la CCD es el uso de reveladores específicos que producen colores definidos facilitando el análisis cualitativo basado en el factor de retardo (R_f); además, se pueden hacer análisis en dos dimensiones que permite separar compuestos pobremente definidos en una primera elución, en una segunda etapa (McCalley, 2002).

De acuerdo a Dräger, (2002) para analizar alcaloides del tropano por diferentes técnicas como cromatografía de gases - espectroscopia de masas (CG-EM), Cromatografía líquida de alta eficiencia - espectroscopia de masas (HPLC-EM) y electroforesis capilar – detección ultravioleta (EC-UV) se debe tener en cuenta lo siguiente:

- Composición de la mezcla de alcaloides del tropano y la estructura de los compuestos que se analizarán.
- La cantidad de muestra disponible.
- La composición total de la muestra.
- La demanda de precisión y sensibilidad.

1.5. Adición de Precursores

En cultivo de tejidos *in vitro*, la adición al medio de cultivo de precursores apropiados o compuestos relacionados, estimula algunas veces la producción de los MS (Gontier et al., 2002). Esta ventaja puede ser aprovechada si el precursor no es costoso. Los estudios iniciales que examinaron la producción de alcaloides con esta alternativa en los años sesenta se han realizado para examinar la producción de alcaloides por este método. Por ejemplo, varios aminoácidos han sido adicionados a medios de cultivo de células en suspensión, debido a que se sabe que ellos son precursores de los alcaloides del tropano e indólicos, con algunos resultados interesantes.

Gontier et al., (2002) adicionaron a callos de *Datura innoxia* precursores combinado con la permeabilización de la membrana con tween 20 para la

liberación al medio de cultivo de hiosciamina y escopolamina. En éste trabajo los cultivos de callos tratadas con 3 % de tween 20 y 1 g/L de fenilalanina y ornitina produjo más escopolamina e hiosciamina (31.7 ± 19 mg/L) que las tratadas con 3% de tween 20 (17.4 ± 6 mg/L) y los controles (2.3 ± 0.7 mg/L).

En otro estudio realizado por Rothe et al., (2001) para la producción de calistegeninas; se elicó el cultivo de raíces de *Atropa belladonna* con quitosanas, pero no indujo una producción alta de estos alcaloides. Incluso los contenidos de hiosciamina permanecieron similares a los de las raíces del control después de un periodo de 6 días de exposición a las quitosanas (la biosíntesis de hiosciamina y calistegeninas siguen las mismas rutas sintéticas de los alcaloides del tropano).

Generalmente, los pasos biosintéticos de aminoácidos a alcaloides son muy complicados y muchas veces se duda, si el aminoácido adicionado es incorporado directamente a la síntesis del alcaloide. Es posible que la adición de precursores no solo afecte la biosíntesis de los alcaloides, sino que también están implicados en otras rutas metabólicas a nivel celular (Robins et al., 1990).

Otra forma de incrementar la producción de alcaloides, es mediante la elicitación con bacterias. Las raíces cultivadas *in vitro* de *Scopolia parviflora* (Solanaceae) y elicadas con *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, permitieron determinar que las cepas Gram-positivas maximizaron la producción de escopolamina, después de 12 horas de exposición. En particular *S. aureus* aumentó la producción de escopolamina mas de 2.8 veces comparadas con el control sobre el mismo periodo de tiempo (Jung et al., 2003).

La elicitación de raíces adventicias de *Scopolia parviflora* con *S. aureus* en un biorreactor a escala de columna pequeña, incrementó la producción de escopolamina; por el contrario, la hiosciamina fue inhibida moderadamente. El contenido de escopolamina incremento a las 72 horas y logró una producción máxima de 25.7 mg/g en base seca, el cual fue 9.9 veces más alta que el control (Min et al., 2007).

1.6. Obtención de Metabolitos Secundarios a Través de la Técnica de Cultivos *In Vitro*

El cultivo *in vitro* es una de las herramientas más útiles de la biotecnología vegetal que explota la totipotencia natural de las células de las plantas, concepto demostrado por primera vez por F. C. Steward (Rout et al., 2006). El cultivo de tejidos es alternativamente llamado cultivo de células, de tejidos y órganos en condiciones *in vitro*. Estos cultivos *in vitro* pueden ser empleados para la propagación de clones libres de enfermedades para su conservación óptima, debido a que se exponen a condiciones de crecimiento controladas como:

- Humedad
- Pobre intercambio gaseoso

- Disponibilidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos
- Reguladores de crecimiento
- Carbón activado

La industria ornamental ha aprovechado inmensamente la propagación *in vitro* para la multiplicación a gran escala de variedad de plantas; por lo tanto, han surgido alrededor del mundo cientos de laboratorios de cultivos de tejidos de plantas, especialmente en los países en vía de desarrollo debido a los bajos costos de producción. Sin embargo, la tecnología de micropropagación es más costosa que los métodos de propagación convencionales, y el costo por unidad de planta se eleva obligando a adoptar estrategias para disminuir los costos de producción y por ende del material vegetal (Rout et al., 2006).

La ventaja del desarrollo de cultivos de células y la ingeniería molecular de plantas es la producción de compuestos importantes para el hombre sin contaminación ni limitaciones económicas. Los cultivos de células y órganos de plantas ofrecen una alternativa promisorio para la producción de sustancias debido a la capacidad de las células vegetales para biosintetizar MS *in vitro*. El cultivo de células es también conveniente en cuanto a que los metabolitos objetivo son obtenidos al controlar las condiciones del cultivo independiente de los cambios climáticos y condiciones ambientales. En consecuencia, los productos están exentos de la acción de los insectos y microorganismos como no lo estarían en el campo (Sato et al., 2001).

Los alcaloides del tropano (escopolamina e hiosciamina) son agentes anticolinérgicos empleados en medicina. Obtenerlos mediante síntesis química es difícil y costoso. Estos compuestos son extraídos de plantas pertenecientes a varias especies de la familia Solanaceae, obteniendo ambas sustancias a través de técnicas agroindustriales. El cultivo *in vitro* es una alternativa interesante, desde la cual se garantiza un abastecimiento estable y uniforme durante el ciclo de vida de la planta, independiente de las variaciones estacionales y su medio circundante (Spollansky et al., 2000). Se han realizado muchos esfuerzos para desarrollar métodos económicamente viables para la obtención de alcaloides del tropano, mediante la técnica de cultivo de células. Los principales esfuerzos de la industria están orientados a la preparación de hiosciamina y escopolamina (Jordan et al., 2006).

Los cultivos *in vitro* son una alternativa potencial para la siembra masiva de plantas con el objetivo de obtener extractos crudos de drogas comerciales. Yamada et al., (1984) reportó la producción de alcaloides en cultivo de raíces de tres especies del género *Duboisia*; a sí mismo, Sippl et al., (1975) reportó la producción de alcaloides del tropano en cultivo de callos de *Duboisia myoporoides*. La producción de estos alcaloides (del tropano) mediante técnicas de cultivos *in vitro* es el centro de muchas investigaciones, utilizando principalmente raíces transformadas de especies de géneros como *Atropa*, *Brugmansia*, *Datura*, *Duboisia*, e *Hyoscyamus* (Hashimoto et al., 1993).

Tanto escopolamina como hiosciamina son sintetizados en las raíces de la planta, consecuentemente el cultivo de raíces normal y transformada es la vía más apropiada para producirlos. El último sistema tiene varias ventajas, como

su alta velocidad de crecimiento, estabilidad genética y patrón de producción que son similares a las plantas *in vivo* (Spollansky et al., 2000).

Muchos de los trabajos recientes sobre el origen biosintético de algunos compuestos, como escopolamina e hiosciamina, han utilizado el cultivo de raíces transformadas como material de experimentación. Estos cultivos son generados por infección de explantes (hojas o tallos) estériles de plantas productoras de los compuestos de interés, heridos ligeramente en su superficie, e inoculados con una suspensión de *Agrobacterium rizogenesis*. La bacteria inserta en las células de las plantas una sección corta de ADN (Ri-ADN) el cual estimula la división celular causando la formación descontrolada de la raíz; las raíces emergentes pueden ser removidas, tratadas con antibióticos para eliminar las bacterias de *A. rizogenesis* innecesarias y seguir cultivándolas en un medio líquido nutritivo y estéril. Las raíces transformadas son subcultivadas en medio fresco cada dos o tres semanas (O'Hogan y Robins, 1998).

De acuerdo a O'Hogan y Robins, (1998) el uso de *Agrobacterium rizogenesis* ofrece muchas ventajas, entre ellas se tienen:

- Material vegetal genéticamente idéntico puede ser generado en grandes cantidades después de la infección con *Agrobacterium rizogenesis*.
- Las raíces crecen a una velocidad constante.
- Los experimentos son conducidos en condiciones asépticas.
- Los precursores pueden ser adicionados fácilmente y la absorción por el tejido puede ser monitoreado directamente. Se pueden realizar múltiples adiciones.
- Los experimentos pueden ser realizados sobre pequeñas cantidades de material, permitiendo un ahorro considerable de las cantidades requeridas de precursores marcados.
- Muchas incorporaciones específicas se pueden seguir al realizar análisis por CG-EM y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) con resultados confiables.

El cultivo de raíces no puede ser realizado con todo tipo de plantas o tejidos. La escopolamina en *D. stramonium* se encuentra como mayor producto en las hojas y al realizar un cultivo de raíces solo se detectaría éste alcaloide en cantidades trazas (O'Hogan y Robins, 1998).

En otras especies, tales como *Hyoscyamus* e híbridos de *Brugmansia*, la escopolamina se acumula en las raíces como el alcaloide más abundante. Entonces un requisito clave para el uso de cultivo de raíces transformadas, es que en dicho tejido ocurra la biosíntesis del compuesto de interés para la planta (O'Hogan y Robins, 1998).

2. JUSTIFICACIÓN

Hiosciamina y escopolamina son alcaloides del tropano medicinalmente importantes, debido a que poseen actividades anticolinérgicas sobre el Sistema Nervioso Central (SNC). Estos alcaloides tienen bien establecido su uso en diferentes áreas de la medicina (oftalmología, cardiología, gastroenterología, etc.). Estas sustancias son sintetizadas por varios géneros de la familia Solanaceae: *Atropa*, *Datura*, *Duboisia*, *Hyoscyamus* y *Scopolia*. Industrialmente los alcaloides son producidos exclusivamente por plantas y su demanda aumenta constantemente (Kursinszki et al., 2005) por lo que en medicina han generado un mercado mundial de \$ 4 billones de dólares anuales (Julsing et al., 2006).

El mercado mundial de los alcaloides se justifica si tenemos en cuenta que sustancias como la escopolamina se utilizan con éxito desde principios del siglo XX. El famoso Neurólogo Charles Loomis Dana utilizó dicha sustancia desde principios de la década de 1920 para el tratamiento de encefalitis letárgica y Parkinson (Kroker, 2004); además, la escopolamina fue la primera de una serie de drogas en ser reconocidas como soporíferos, aunque fue reemplazada rápidamente por barbitúricos (Winter, 2005).

En la actualidad la escopolamina es reconocida como un agente antimuscarínico (usado como analgésico) y un relajante muscular suave. También es un agente antiespasmódico usado ampliamente en el tratamiento contra diferentes enfermedades, empleado en la preparación de medicamentos (Steenkamp et al., 2004); en procedimientos psicológicos donde es necesaria la sugestión (Olsen, 2006) y en estudios de modelos biológicos donde se establece la relación señal-efecto en diferentes especies animales (Morrison, 2002).

Debido a los usos importantes que se le dan en medicina a este tipo de alcaloides es fundamental el desarrollo de métodos analíticos para su determinación en plantas desde diferentes campos como la química farmacéutica, toxicología forense y medicina naturista (Theodoridis et al., 2003).

En el proceso de determinar alcaloides se emplean diferentes metodologías. En el caso del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, un paso importante es la extracción de los compuestos de interés que se puede llevar a cabo por medio de diferentes técnicas, una de las más utilizadas es la Extracción en Fase Sólida (EFS) que tiene la ventaja de emplear pocas cantidades de solvente, además de realizarse en poco tiempo. La técnica de EFS es usada ampliamente en diferentes áreas y para la extracción de alcaloides del tropano se cuenta con los estudios de Kursinszki et al., (2005); Hibi et al., (1992); Kang et al., (2004); Khanam et al., (2001), entre otros.

Las condiciones para la cuantificación por HPLC de los alcaloides de la familia Solanaceae es muy amplia y existen muchas referencias al respecto entre las

que se encuentran Theodoridis et al., (2003); Steenkamp et al., (2004); Zanolari et al., (2003); Tiburcio et al., (1985) y Gallego et al., (2003).

Debido a que los alcaloides de la familia Solanaceae son MS que se biosintetizan en muy pequeñas cantidades en las plantas; el propósito particular de este trabajo fue evaluar el efecto que tiene la adición de precursores de los alcaloides del tropano tal como L-Arginina en la capacidad biosintética de las raíces cultivadas *in vitro* de *Brugmansia candida*, especie que se encuentra ampliamente distribuida en nuestra región y puede ser usada como materia prima para la obtención de alcaloides del tropano a nivel industrial.

La adición de precursores a los medios de cultivo *in vitro* puede estimular la producción de MS en las plantas, logrando que se produzcan en mayores cantidades de lo normal. Un ejemplo de esto son los trabajos realizados por Gontier et al., (2002); Min et al., (2007) y Robins et al., (1991) donde la elicitación con precursores aumentó la concentración de alcaloides como hiosciamina y escopolamina en las raíces cultivadas *in vitro* de *Scopolia parviflora* y *Datura stramonium* respectivamente. Por esta razón, la pregunta que se responde en este trabajo es: ¿Qué efectos tendrá la adición de precursores, como L-Arginina, sobre la capacidad biosintética de los alcaloides del tropano en las raíces normales cultivadas *in vitro* de *B. candida*?

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

- Evaluar el efecto de L-Arginina como precursor en la producción de escopolamina en raíces cultivadas *in vitro* de *Brugmansia candida* (Solanaceae).

3.2. Objetivos Específicos

- Obtener raíces normales en condiciones *in vitro* de *Brugmansia candida*.
- Elicitar raíces cultivadas *in vitro* de *B. candida* con L-Arginina a concentraciones de 10, 100 y 1000 mg/L.
- Extraer escopolamina de manera selectiva y eficientemente para la obtención de datos fitoquímicos exactos, precisos y reproducibles.
- Cuantificar el contenido de escopolamina en raíces cultivadas *in vitro* de *Brugmansia candida* elicitadas con L-Arginina a concentraciones de 10, 100 y 1000 mg/L por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).

4. METODOLOGÍA

Para este proyecto de investigación se usaron materiales, equipos y reactivos que permitieron obtener los resultados presentados en la sección 5 y por ende cumplir los objetivos propuestos. A continuación se presentan dos listas correspondientes a los materiales y reactivos empleados.

4.1. Materiales

Material	Marca
pH-Meter CG-824 No 3203121	Schott Gerate
Autoclave automática mod. 144 con generador de vapor, indicador de temperatura y presión	Sterilof
Autoclave manual mod. 25X de 25L	All American
Agitador magnético con calentamiento, No 77591238980	Heidolph
Cabina de flujo laminar sobremesa con control filtro hepa	Purificación y Análisis de Fluidos
Sonicador (ultrasonido) Hans Schmidbauer GMBH D-78224	Elma
Vortex para tubos de ensayo MS1 S1	IKA
C ₁₈ , 125 X 4,6 mm, 5 µm	Hewlett Packard
Rotaevaporador Laborota 4000	Heidolph
Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC) HP 1100	Hewlett Packard
Balanza analítica electrónica de precisión 0.1 g cap. 210g modelo ab204	Mettler Toledo
Soxhlet de 50 mL	Polco
Estufa digital programable tipo 1505 330000 # 950841	WTB binder
Agitador rotatorio mod. G-10	New Bruns Wick Scientific EDISON

4.2. Reactivos

Reactivo	Marca
Medio SH (Schenk and Hildebrand, 1972), sales grado analítico	MERK, Analyticals, Codex
Diclorometano (CH ₂ Cl ₂), grado analítico	Mallinckrodt
Metanol (C ₂ H ₅ OH), grado analítico	Mallinckrodt
Hexano (C ₆ H ₁₄), grado analítico	Mallinckrodt
Hidróxido de amonio al 25% (NH ₄ OH•3H ₂ O), grado analítico	Mallinckrodt
Sulfato de sodio anhidro (Na ₂ SO ₄), para análisis	Mallinckrodt
Difosfato de potasio (KH ₂ PO ₄), para análisis	Codex
Ácido fosfórico (H ₃ PO ₄), 85% grado analítico	Mallinckrodt
Acetonitrilo (CH ₃ CN), grado HPLC	Mallinckrodt
Metanol grado HPLC	Mallinckrodt
Agua grado HPCL (H ₂ O), filtrada con membrana de 0.45µm	MilliQ
Escopolamina (C ₁₇ H ₂₁ NO ₄), para análisis	Sigma

Continuación de la lista de reactivos

L-Arginina (C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂), para análisis	Sigma
Solución tampón pH 4.0, reactivo para análisis	Mol Labs.
Solución tampón pH 7.0, reactivo para análisis	Mol Labs.
Hidróxido de sodio sólido (NaOH)	Codex
Ácido clorhídrico 37% (HCl), grado analítico	EM
Hormona ácido α -naftalenacético (ANA) y vitaminas piridoxina, tiamina, niacina y mio-inositol	Sigma

4.3. Condiciones Agroclimáticas

El trabajo experimental se llevó a cabo en el laboratorio del Grupo de Biotecnología - Productos Naturales (GB-PN) de la Escuela de Tecnología Química de la Universidad Tecnológica de Pereira (UTP) ubicada en La Julita. La UTP se encuentra localizada en un pequeño valle formado por la terminación de un contrafuerte que se desprende de la cordillera central a los 4 grados y 49 minutos de latitud norte y 75 grados y 42 minutos de longitud oeste de Greenwich. La zona cuenta con una humedad relativa de 83%, temperatura media de 21°C y una altura aproximada de 1411 m sobre el nivel del mar que corresponde a una presión atmosférica de 8.78×10^1 KPa.

4.4. Material Vegetal

Las raíces que se usaron en esta investigación provienen de trabajos previos del GB-PN, a partir de semillas recolectadas en el Parque Regional Nacional Ucumari (PRNU). Las raíces se encontraban en medio de cultivo Schenk and Hildebrandt (SH) (1972) a la mitad (SH/2) suplementadas con 3% de sacarosa y 3 mg/L de ácido α -naftalenacético (ANA).

Los cultivos *in vitro* de raíces de *Brugmansia candida* fueron elicitados a 10 (tratamiento 1), 100 (tratamiento 2) y 1000 (tratamiento 3) mg/L de L-Arginina, además de su respectivo control. 500 mg de raíces fueron cultivadas en 50 mL de medio SH suplementados con 3% de sacarosa, 3 mg/L de ANA, ajustando el pH a 5.8 previa a la esterilización por 20 min a 125 psi. Los cultivos fueron puestos sobre un agitador rotatorio a 80 rpm en la oscuridad y temperatura ambiente (23-25°C).

En los anexos 1 y 2 se muestra la composición del medio SH y su preparación, respectivamente.

4.5. Diseño Experimental

Para la toma de datos de biomasa y concentración de escopolamina previa extracción, se siguió el siguiente diseño experimental:

Tiempo de Experimento	35 Días
Toma de la Primera Muestra	Al Día 5
Periodo de Muestreo	Cada 5 Días
Número de muestras por Dato	3 Muestras
Número de Experimentos	2 Experimentos

4.6. Preparación de las Muestras

Las raíces cultivadas *in vitro* de *B. candida* se filtraron por gravedad y se determinó su peso en base húmeda (BH). Luego se secaron en una estufa a 60°C por 48 horas hasta peso constante. Las raíces secas se llevaron al desecador por 8 horas y se determinó su peso en base seca (BS). El material seco se refrigeró a -10°C hasta el día de la extracción.

4.7. Índice de Crecimiento

Con el objeto de analizar el efecto del precursor L-Arginina sobre las raíces de *B. candida* cultivadas *in vitro* se calculó el Índice de Crecimiento (IC), el cual es una medida del aumento de masa respecto al inóculo (Yoshimatsu et al., 2004). El IC se obtuvo con la E-1.

$$IC = \frac{MF}{MI} ;$$

(E-1)

· $MI = \text{Biomasa del inóculo}$ · $MF = \text{Biomasa el día de la medición}$

4.8. Extracción de Escopolamina

La extracción de escopolamina se realizó con un procedimiento que tiene en cuenta las propiedades ácido-base de este alcaloide. De 10 a 200 mg de raíces secas normales cultivadas *in vitro* pulverizadas fueron extraídas según lo descrito por Bruneton, (1991) con leves modificaciones. Se usó *n*-hexano para desengrasar las raíces y diclorometano en vez de cloroformo para extraer los alcaloides.

El procedimiento de extracción que se empleó se presenta en la figura 5.

4.9. Condiciones Para la Cuantificación de Escopolamina por HPLC

Las condiciones cromatográficas empleadas en este trabajo son una adaptación de las empleadas por Kursinszki et al., (2005). Las diferencias consistieron en cambiar la fase móvil, acetonitrilo por metanol al 20%. El volumen de inyección fue de 20 µL que correspondía al tamaño del loop. En la

tabla 6 se comparan las condiciones de Kursinszki et al., (2005) y las seguidas en este trabajo.

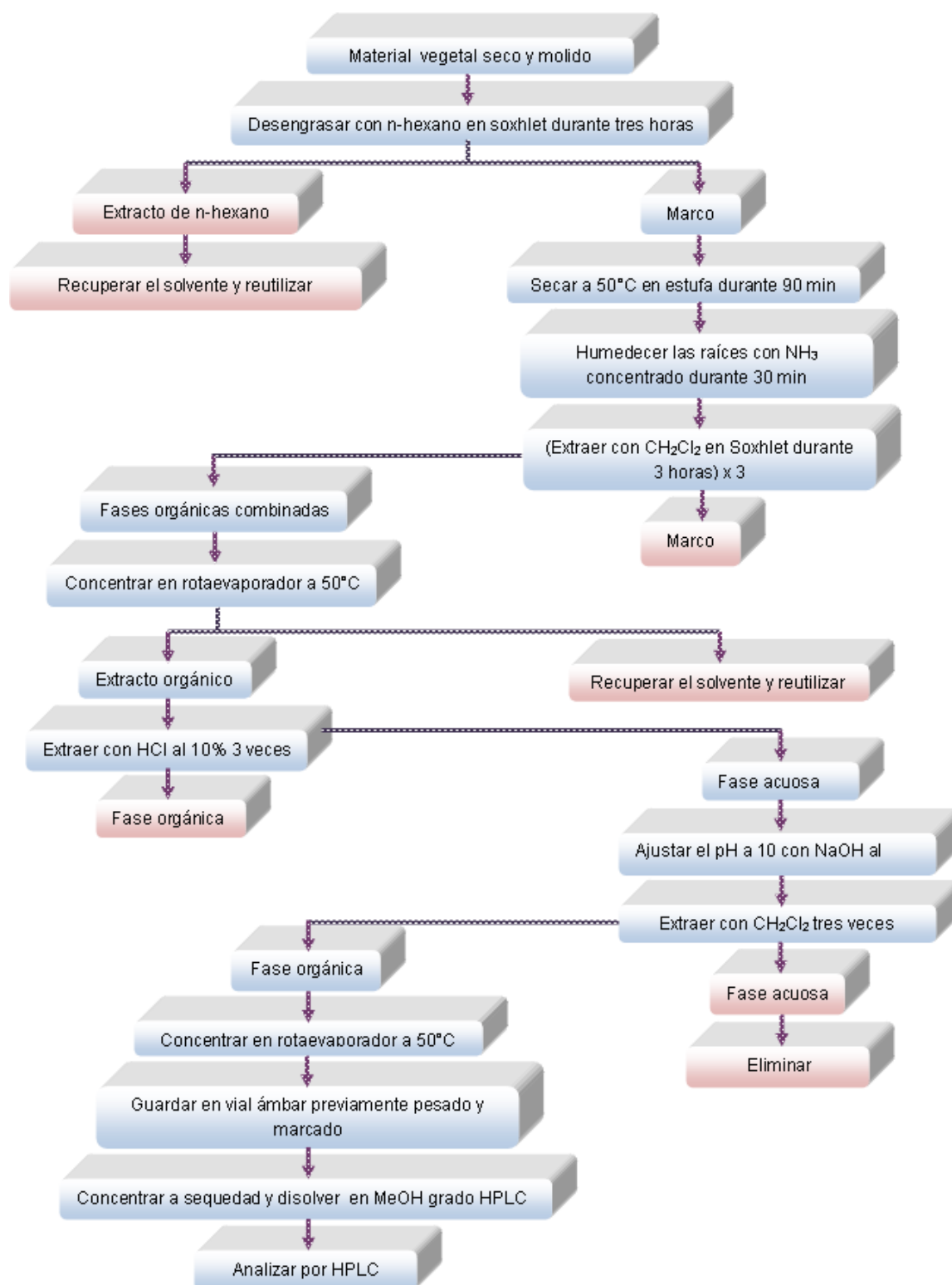


Figura 5 Procedimiento de extracción de alcaloides del tropano (Bruneton, 1991)

Los datos fueron generados por el software “HP ChemStation” instalado para el control computarizado del HPLC.

Tabla 6 Comparación de condiciones de HPLC para la cuantificación de alcaloides del tropano

Columna	Detector	Temperatura	Inyección	Flujo	Fase móvil	Referencia
Luna C ₁₈ , 250 X 4.6 mm, 5 µm	UV, 210 nm	30°C	5 µL	1.0 mL/min	CHCN:MeOH:Buffer ² (12:7.9:80.1)	Kursinszki et al., (2005)
Hypersil C ₁₈ , 150 X 4.6 mm, 5 µm	UV, 210 nm	30°C	20 µL	1.3 mL/min	MeOH:Buffer ¹ (20:80)	Presente Trabajo

¹Buffer: KH₂PO₄-K₂HPO₄ (0.877-0.123, 30mM); ²Buffer: KH₂PO₄-K₂HPO₄ (0.815-0.185, 30 mM)

4.10. Soluciones Estándar y Curva de Calibración

Se preparó una solución stock de escopolamina de 1000 mg/L a partir de la cual se prepararon 6 soluciones estándar de 1, 5, 10, 25, 50 y 100 mg/L para realizar la curva de calibración bajo las condiciones descritas en la tabla 6. Las diluciones sucesivas de la solución stock se realizaron con agua grado HPLC. La solución stock y soluciones estándar fueron almacenadas a -10°C y llevados a temperatura ambiente antes de usar.

4.11. Parámetros Evaluados Para la Validación del Método

Una vez desarrollado un método de análisis por HPLC, al igual que toda técnica analítica, debe validarse; es decir, se debe confirmar y documentar que los resultados producidos por el método son confiables. Para esto se evaluarán los siguientes parámetros:

4.11.1. Linealidad

Para la determinación de la linealidad se prepararon una serie de seis soluciones estándar a partir de una solución stock, comprendiendo el rango estimado de trabajo. Cada solución se inyectó siete veces y se determinó la curva de regresión $Y = mX + b$ por el método de los mínimos cuadrados.

4.12.2. Intervalos de Confianza

El límite de confianza para el estimador de la pendiente (m) se calculó en función de su varianza S_m , mediante la E-2.

$$m = m \pm tS_m$$

(E-2)

En donde “t” es el factor de confiabilidad requerido para la curva de calibración. La presente investigación trabajó con un nivel de confiabilidad del 95% que corresponde a $t = 1.96$. De manera similar, el límite de confianza del estimador de la ordenada al origen se calculó en función de su varianza S_b (E-3).

$$b = b \pm tS_b$$

(E-3)

4.12.3. Coeficiente de Regresión Lineal

El coeficiente de regresión lineal “r” se determinó para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto $Y = mX + b$, calculados mediante las ecuaciones que se muestran en el anexo 3.

4.12.4. Precisión

La precisión se expresó matemáticamente como la desviación estándar “ σ ” estimada analíticamente por “s” o más convenientemente como la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (CV). El criterio de aceptación puede ser variable y estará dictado por los objetivos buscados. Así, internacionalmente se acepta una RSD del sistema de menos del 2% (Quattrocchi et al., 1992).

Las ecuaciones empleadas para determinar la validez del método desarrollado en HPLC en este trabajo para la cuantificación de escopolamina se describen en el anexo 3 y los software empleados para hacer los cálculos fueron Microsoft Office Excel 2007 y Microcal Origin 6.0.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Morfología de las Raíces

Las raíces adventicias formadas a partir de callo se convirtieron en una masa esférica (ver figura 6). Basados en el trabajo de Min et al., (2007) con raíces adventicias de *Scopolia parviflora* (Solanaceae) el modelo de crecimiento de estas raíces puede ser clasificado en dos grupos, teniendo en cuenta sus diferencias morfológicas:



Figura 6 Morfología de las raíces cultivadas *in vitro* de *B. candida*

- 1) La región que crece activamente, que incluye la parte superior y la superficie central de la esfera de raíz, las raíces jóvenes proyectan su crecimiento hacia la periferia. Generalmente son de color amarillo-café claro (las cuales presentan ramificaciones hacia el exterior).
- 2) La región que no crece activamente, el interior de la raíz que cambia a un color café con tejidos viejos y senescentes.

En cuanto al tono de color, las raíces del control y el tratamiento 1 (elicitadas con 10 mg/L de L-Arginina) no presentaron una diferencia visual significativa; en comparación con las raíces del tratamiento 2 (elicitadas con 100 mg/L de L-Arginina) que presentaron una tonalidad más clara. De manera contraria, las raíces del tratamiento 3 (elicitadas con 1000 mg/L de L-Arginina) con el transcurso del tiempo presentaron una coloración oscura, muy diferente al matiz de las raíces de los otros dos tratamientos. Este color oscuro posiblemente está relacionado con el envejecimiento de los tejidos con producción de pigmentos café en la raíz, debido probablemente a la acumulación de compuestos fenólicos en los mismos (Jouhikainen et al., 1999).

5.2. Producción de Biomasa

En la tabla 7 se presenta el perfil de producción de biomasa de las raíces *in vitro* de *B. candida* durante 35 días de cultivo, de los tres tratamientos realizados con L-Arginina a concentraciones de 10, 100 y 1000 mg/L en el medio de cultivo SH. A cada medio se adicionó un inóculo de 500 mg de tejido de raíz fresca.

Tabla 7 Peso de las raíces cultivadas *in vitro* de *B. candida*

TIEMPO (Días)	Tratamiento con L-Arginina (mg/L)	PBH ¹ (g)	PBS ² (g)
5	CONTROL	0,7040	0,0229
	10	0,7991	0,0194
	100	0,7435	0,0234
	1000	0,7249	0,0263
10	CONTROL	1,2619	0,0558
	10	1,2714	0,0545
	100	0,8961	0,0349
	1000	0,7251	0,0246
15	CONTROL	2,6203	0,1110
	10	2,8257	0,1188
	100	0,9950	0,0329
	1000	0,9599	0,0317
20	CONTROL	5,0529	0,1892
	10	3,5087	0,1636
	100	1,2530	0,0503
	1000	0,8545	0,0329
25	CONTROL	5,6924	0,2052
	10	7,0711	0,2150
	100	1,3002	0,0447
	1000	0,8693	0,0175
30	CONTROL	9,2702	0,2880
	10	8,7505	0,2678
	100	1,7083	0,1062
	1000	0,8480	0,0391
35	CONTROL	9,7796	0,3193
	10	9,7713	0,2757
	100	2,1689	0,0691
	1000	0,9883	0,0619

¹PBH = Peso en Base Húmeda (BH) de las raíces cultivadas *in vitro* de *B. candida*.

²PBS = Peso en Base Seca (BS) de las raíces cultivadas *in vitro* de *B. candida*.

(Los datos reportados son la media de tres datos y realizados por duplicado)

5.2.1. Índices de Crecimiento

Las raíces del control y el tratamiento 1 (como se observa en la tabla 7) presentaron un patrón de crecimiento similar y muy diferente al crecimiento de las raíces de los tratamiento 2 y 3. En principio estas diferencias de crecimiento, se pueden atribuir a diferencias morfológicas, como se puede deducir de los valores de índice de crecimiento (IC) de las raíces del control y los tres tratamientos presentados en la tabla 8.

Tabla 8 Índices de crecimiento (IC) de las raíces de *B. candida* tratadas con L-Arginina

Días	Índice de Crecimiento ¹			
	Control (0 mg/L) ²	Tratamiento 1 (10 mg/L) ²	Tratamiento 2 (100 mg/L) ²	Tratamiento 3 (1000 mg/L) ²
5	1.4	1.6	1.5	1.4
10	2.5	2.5	1.8	1.5
15	5.2	5.7	2.0	1.9
20	10.1	7.0	2.5	1.7
25	11.4	14.1	2.6	1.7
30	18.5	17.5	3.4	1.7
35	19.6	19.5	4.3	2.0

¹IC = MF/MI, MI = biomasa del inoculo y MF = biomasa el día de la medición

²Concentración de L-Arginina

Los valores de IC, para el día 35, del control y el tratamiento 1 están muy cercanos entre si, 19.6 y 19.5, respectivamente y son 4.5 veces mayores al valor de IC del tratamiento 2. El IC del tratamiento 2 duplica (2.15 veces) al IC del tratamiento 3 en la medición del día 35.

Estos valores de IC de las raíces normales cultivadas *in vitro* difieren de los resultados obtenidos por Giulietti et al., (1993) para sus mejores líneas de raíces transformadas genéticamente de *Brugmansia candida* con valores de IC de 24.0 y 21.9 al día 21 de cultivo.

De acuerdo con la tabla 8 el mejor valor de IC el día 21 (dato obtenido por interpolación) lo tuvo el control con 10.4. Esta diferencia marcada tiene explicaciones razonables. En primer lugar, se tiene la cantidad de inóculo, Giulietti y colaboradores emplearon 200 mg en base húmeda, que corresponde solo al 40% del utilizado en este trabajo (500 mg). Esto permite a una cantidad dada de raíces disponer de una mayor cantidad de nutrientes, lo que les acelera su crecimiento (Min et al., 2007).

En segundo lugar está el medio empleado, en la referencia se utilizó B5 el cual es diferente al SH utilizado en este trabajo que contiene más calcio, fósforo, cobre, yodo, cobalto y magnesio, pero menos hierro, zinc, molibdeno y manganeso. Obviamente estos medios de cultivo difieren en la composición de sus sales, lo cual influye indudablemente en el crecimiento de las raíces. Un ejemplo de esto es el estudio de Nussbaumer et al., (1998), que cultivaron

raíces transformadas del híbrido *Datura candida* X *D. aurea* en diferentes medios de crecimiento (Gamborg, B5; Murashige y Skoog, MS; Woody Plant, WP, B5/2, MS/2 y WP/2) para cada uno de ellos se evaluó la producción de la biomasa y de alcaloides específicamente.

En tercer lugar está el factor verdaderamente determinante en las diferencias de los IC, que debió ser el empleo de raíces normales de este trabajo en vez de raíces transformadas genéticamente del empleado por Giulietti et al., (1993). El cultivo de raíces normales tiene una velocidad de crecimiento lenta, comparadas con las raíces transformadas, lo cual las hace poco atractivas para los sistemas de producción (Jouhikainen et al., 1999).

Los cultivos de raíces transformadas de muchas especies de la familia Solanaceae, presentan gran potencial para la producción de biomasa eficientemente y alcanzar un contenido alto de alcaloides del tropano. Otro ejemplo de lo anterior se tiene con el trabajo con raíces transformadas de *Hyoscyamus niger* de Zhang et al., (2004) que alcanzó un IC de 45 y una concentración de escopolamina de 411 mg/L que corresponde aproximadamente a 16.44 mg de escopolamina.

El mejor IC en este trabajo al día 28 se alcanzó con el tratamiento 1 (16.1), mayor al obtenido por Moyano et al., (2007) en las raíces transformadas de *Nicotiana tabacum* cuyo valor de IC fue de 13.6 para el mismo día. El control tiene un valor de IC para el día 21 de 10.4 mucho mayor que el obtenido por Min et al., (2007) de 5.0 en cultivo de raíces adventicias de *Scopolia parviflora*.

Estos resultados indican que con la metodología empleada, el cultivo de raíces normales aún presentando valores de IC inferiores comparados con algunos trabajos previos, no deja de ser un recurso potencial para el estudio de MS, debido a que dependiendo del manejo adecuado de las variables (medio de cultivo, tipo de raíz, biomasa del inóculo, reguladores de crecimiento, precursores apropiados, fotoperíodo) se pueden obtener excelentes resultados.

Los resultados y las observaciones anteriores indican un efecto significativo del precursor de alcaloides del tropano, L-Arginina, sobre el crecimiento de las raíces. Previamente Zhang et al., (2004) encontraron, en un estudio con líneas de raíces transformadas genéticamente, que un contenido alto de MS en los tejidos, estaba asociado con un crecimiento pobre del tejido; por lo tanto, la productividad total neta de los MS permanecía baja. De manera similar, Jouhikainen et al., (1999) observaron que la morfología de las raíces tiene una influencia considerable sobre la producción de MS. De acuerdo con estas conclusiones es de esperar que las raíces de los tratamientos con L-Arginina tengan una producción alta de MS, lo cual es inversamente proporcional al crecimiento, independiente de si se trata de raíces transformadas genéticamente o no.

5.2.2. Curvas de Crecimiento de Raíces Cultivadas *in vitro* de *B. candida*.

En las figuras 7 y 8 se muestran las curvas de crecimiento, en base húmeda (BH) y base seca (BS) respectivamente, de las raíces cultivadas *in vitro* de *B.*

candida del control y los tres tratamientos. Las raíces del control y el tratamiento 1 presentaron un modelo de crecimiento similar al de las raíces adventicias trabajadas por Min et al., (2007).

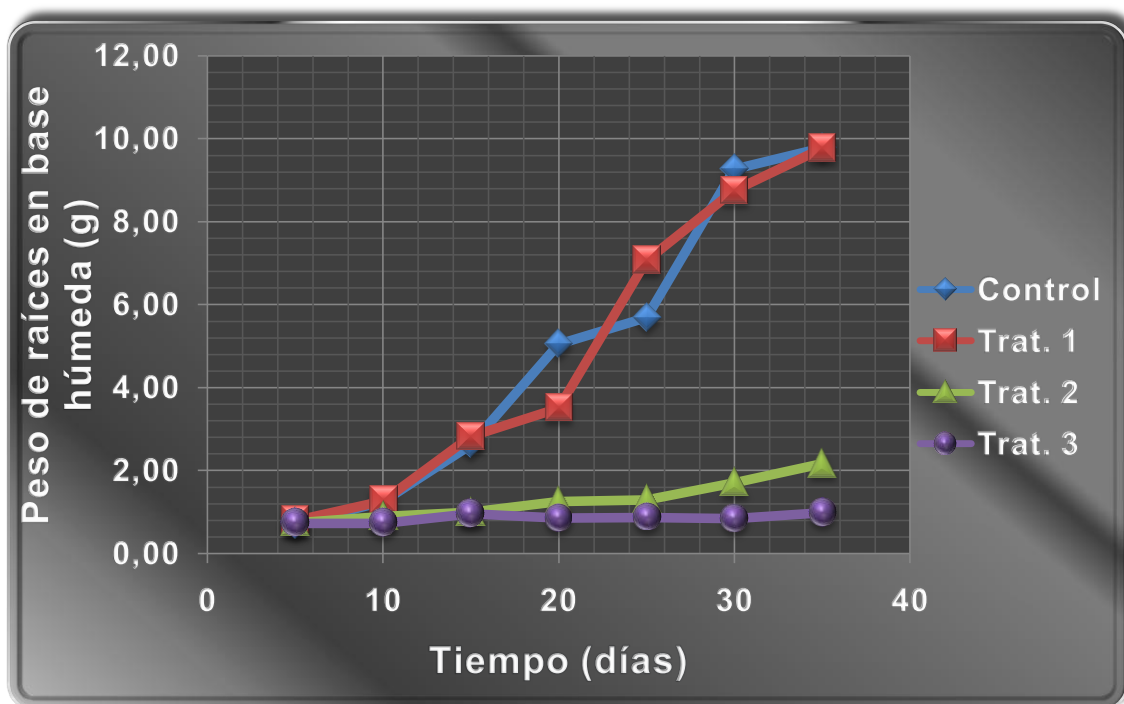


Figura 7 Curva de crecimiento promedio de las raíces *in vitro* de *B. candida* en base húmeda (BH)

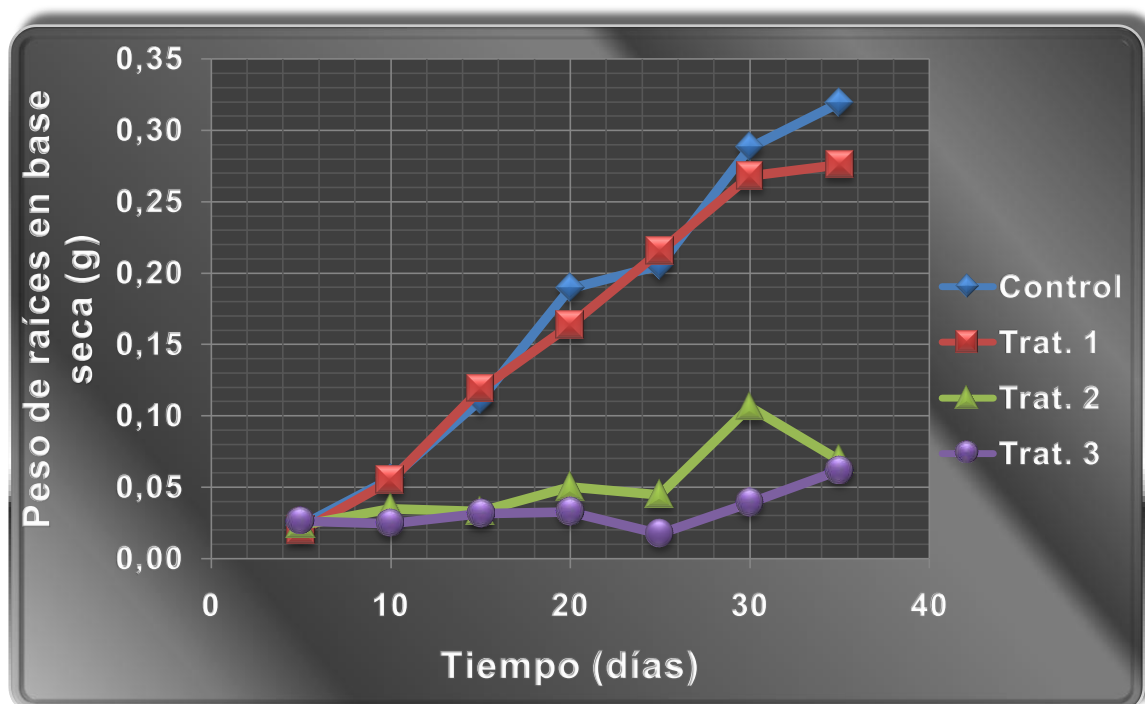


Figura 8 Curva de crecimiento de las raíces *in vitro* de *B. candida* en base seca (BS)

Como se observa en las figuras 7 y 8 las diferencias en peso en el transcurso de los 35 días de duración del experimento, este mostró que las raíces del control y los tres tratamientos presentaban diferencias significativas.

El modelo de crecimiento descrito por Min et al., (2007) de las raíces presenta tres fases. En este trabajo se presentaron las mismas tres fases de forma ligeramente diferente de acuerdo a las figuras 7 y 8 como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9 Modelo de crecimiento de las raíces cultivadas *in vitro* de *B. candida*

Fase	Días de las respectivas fases	
	Modelo de Min et al., (2007)	Modelo del presente trabajo
1. Adaptación	0-4 días de cultivo	0-5 días de cultivo
2. Exponencial-Lineal	4-24 días de cultivo	5-30 días de cultivo
3. Estacionaria	24-30 días de cultivo	30-35 días de cultivo

Durante la fase de adaptación las raíces se adecuaron al medio fresco y a las condiciones medioambientales renovadas. En la fase exponencial-lineal se presenta el periodo de crecimiento de las raíces, es en esta fase donde ocurre un aumento considerable de la biomasa en base húmeda y por consiguiente en base seca. Después del día 30 se observó un decrecimiento, llegando en este punto a la fase estacionaria, periodo en el cual las raíces llegan a su punto máximo de crecimiento y después del cual empiezan a morir (Gallego et al., 2003). Esta fase es el límite para subcultivar las raíces, pues la fase exponencial - lineal es la ideal para que las raíces comiencen un nuevo ciclo.

Como se puede deducir de las figuras 7 y 8 a medida que transcurre el tiempo las raíces del control y el tratamiento 1 aumentan continuamente de peso lo cual se debe al desarrollo similar de todas las raíces; es decir, a su igual adaptación. Las raíces de los tratamientos 2 y 3 no aumentan considerablemente su peso, inclusive en el tratamiento 2 a 100 mg/L de L-Arginina se observó un decrecimiento desde el día 30 hasta el 35 debido al efecto tóxico del precursor adicionado al medio de cultivo.

Las curvas de crecimiento de las raíces *in vitro* de *B. candida* de las figuras 7 y 8 para el control y el tratamiento 1 también tienen un comportamiento similar al presentado por las raíces transformadas de *Datura stramonium* (Robins et al., 1991), *Duboisia myoporoides* -*D.leichardtii* (Yoshimatsu et al., 2004), *Hyoscyamus niger* (Zhang et al., 2004) y raíces normales de *Atropa belladonna* (Rothe et al., 2001), todas de la familia Solanaceae; sin embargo, se presentan diferencias leves en la duración de las diferentes fases, principalmente en los días finales de la fase exponencial-lineal que varía entre 17 y 30 días. Estas diferencias pueden tener la misma explicación que la presentada para las diferencias de los valores de IC, que están relacionadas con la cantidad de inóculo, medio de cultivo empleado y uso de raíces normales o transformadas.

Por su parte, las curvas de crecimiento de las raíces *in vitro* de *B. candida* de las figuras 7 y 8 para los tratamientos 2 y 3 no presentan similitud a los modelos encontrados en las referencias, particularmente los de Min et al., (2007). Cuando se compara el contenido de alcaloides y su concentración en las raíces se llega a la conclusión interesante de que las raíces que producen un nivel elevado de escopolamina llegan rápidamente a su máximo de crecimiento (para el tratamiento 3, al día 15) e igualmente envejecen rápido cuando se comparan con el control; una conclusión similar fue propuesta por Jouhikainen et al., (1999) trabajando con raíces transformadas de *Hyoscyamus muticus*. Dicha conclusión aplica principalmente para el tratamiento 3. Las raíces del tratamiento 2 presentan un máximo de crecimiento al día 30 (ver figura 8) y una concentración superior al control después del día 7 (ver figura 9), por lo que la misma conclusión aplica pero de una manera menos ajustada. De forma general, para este trabajo, el contenido y concentración de escopolamina fue inversamente proporcional al crecimiento de las raíces.

5.3. Cuantificación de Escopolamina por HPLC

En la tabla 10 y figura 9 se muestra el perfil de la concentración de escopolamina en las raíces cultivadas *in vitro* de *B. candida* durante 35 días de cultivo. La curva de producción de escopolamina para el control y los tratamientos 1 y 2 se asemeja a la obtenida por Min et al., (2007) y Yoshimatsu et al., (2004) para las especies de *Scopolia parviflora* y el híbrido *Duboisia myoporoides*-*D. leichardtii* (Solanaceae) respectivamente, en el sentido de una producción relativamente constante entre un rango pequeño de concentraciones.

Tabla 10 Concentración de escopolamina en el control y los tres tratamiento

TIEMPO (Días)	Tratamiento con L-Arginina (mg/L)	[] ³ mg/g	TIEMPO (Días)	Tratamiento con L-Arginina (mg/L)	[] ³ mg/g
5	CONTROL	3,6300	20	100	1,9455
	10	1,7106		1000	1,8744
	100	3,1040	25	CONTROL	0,5148
	1000	6,1966		10	0,7298
10	CONTROL	1,4994		100	2,0749
	10	1,3123		1000	1,4134
	100	2,1970	30	CONTROL	0,5719
	1000	8,5396		10	0,9407
15	CONTROL	1,9782		100	1,1635
	10	1,2346		1000	1,6157
	100	2,4688	35	CONTROL	0,6544
	1000	10,1344		10	0,4130
20	CONTROL	0,5280		100	1,3121
	10	0,6436		1000	1,2291

³[] = Concentración de escopolamina en raíces en base seca.
(Los datos reportados son la media de tres datos e IBIA 34)

En este caso para el control, se produjo de 0.52 a 0.37 mg/g; para el tratamiento 1, de 1.71 a 0.42 mg/g; para el tratamiento 2, de 3.11 a 1.32 mg/g;

el tratamiento 3 por su parte mostró una curva de producción no reportada por la literatura, con un incremento desde el principio del cultivo llegando a un máximo de producción el día 15 (10 mg/g) descendiendo drásticamente y alcanzando un mínimo de concentración de 1.23 mg/g al día 35.

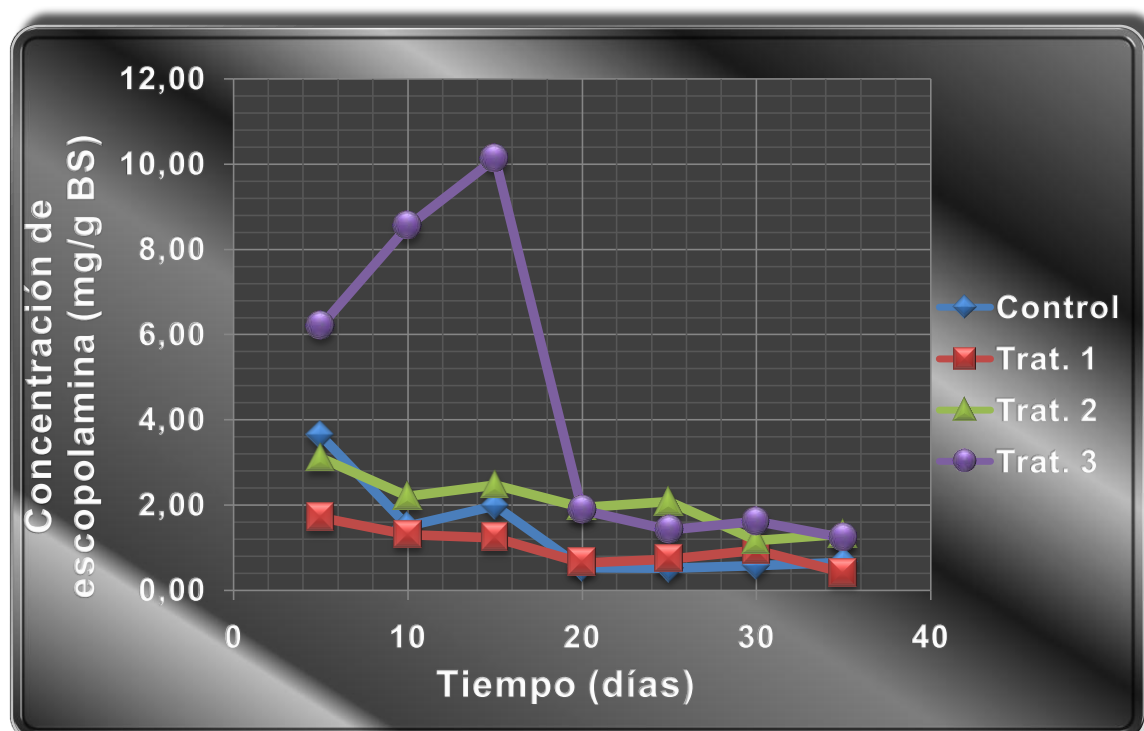


Figura 9 Concentración promedio de escopolamina del control y los tres tratamientos en raíces normales de *B. candida*

Como se muestra en la tabla 10, el tratamiento 3 en el día 15 se obtuvo la mayor concentración de escopolamina/biomasa de raíces correspondiente a 10.1344 mg/g BS que equivale al 1.0134%. Este es un buen valor si se compara con el 0.04-0.12% obtenido por Spollansky et al., (2000) y el 0.26% obtenido por Giulietti et al., (1993) con raíces transformadas, además del 0.4% de Gallego et al., (2003) con raíces normales de *B. candida*.

Posteriormente, el rendimiento en el control varió entre los días 20 y 35, entre 0.5 y 0.6 mg/g. Para el tratamiento 1, la producción mantuvo una tendencia a disminuir, excepto en el día 30 que hubo un leve incremento en la producción de escopolamina de 0.73 mg/g a 0.95 mg/g, aunque volvió a disminuir en el día 35 a 0.42 mg/g. En el tratamiento 2, de los días 10 al 25 la biosíntesis del alcaloide se mantuvo entre 1.95 y 2.47 mg/g. El día 30 del tratamiento la concentración disminuyó a 1.17 mg/g e incrementó levemente para el día 35 a 1.32 mg/g. El tratamiento 3, mostró la mejor curva de síntesis para la escopolamina, empezando el día 5 a una concentración de 6.0 mg/g y alcanzando un valor máximo en el día 15 con una concentración de 10 mg/g, descendiendo drásticamente el día 20 a 1.88 mg/g y al día 25 a 1.42 mg/g. El último día (35) del tratamiento, se presentó el rendimiento más bajo, 1.23 mg/g. El comportamiento de la producción total de escopolamina se rigió por la cantidad presente en las raíces, puesto que la mayor cantidad de cualquier MS se encuentra a nivel intracelular (Robins et al., 1990).

Los perfiles de producción de escopolamina en las raíces en base seca (BS) se presentan en la figura 10. La producción total de escopolamina tiende a disminuir levemente desde la primera medición en el control y los tratamientos 1 y 2; para el tratamiento 3 la producción aumentó rápidamente hasta el día 10 y disminuyó desde ahí hasta el día 25.

En el control y los tratamientos 1 y 2 se observó una tendencia especial en la producción de escopolamina en las dos primeras mediciones (ver figura 10). La producción de escopolamina descendió, lo que se puede interpretar como una sobreproducción de escopolamina en los primeros días que disminuyó gradualmente, debido muy probablemente, a la perturbación de las raíces, causada por el corte y la transferencia a un nuevo medio (Robins et al., 1991). Lo anterior está de acuerdo con lo planteado por Blechert et al., (1995) al mencionar el sofisticado sistema de defensa de las plantas, en el cual los metabolitos encargados de esta labor son sintetizados solamente después de que la planta ha sido atacada, para evitar que los organismos desarrollen cierta resistencia adaptativa a estos compuestos.

El tratamiento 3 mostró un comportamiento diferente, la producción de escopolamina no tiende a disminuir; en su lugar, tiende a aumentar, aunque las raíces por sí mismas pueden producir escopolamina suficientemente debido a la perturbación ejercida por el precursor, L-Arginina puede ser la causante de este comportamiento al incorporarse en la biosíntesis del alcaloide y aumentar su producción.

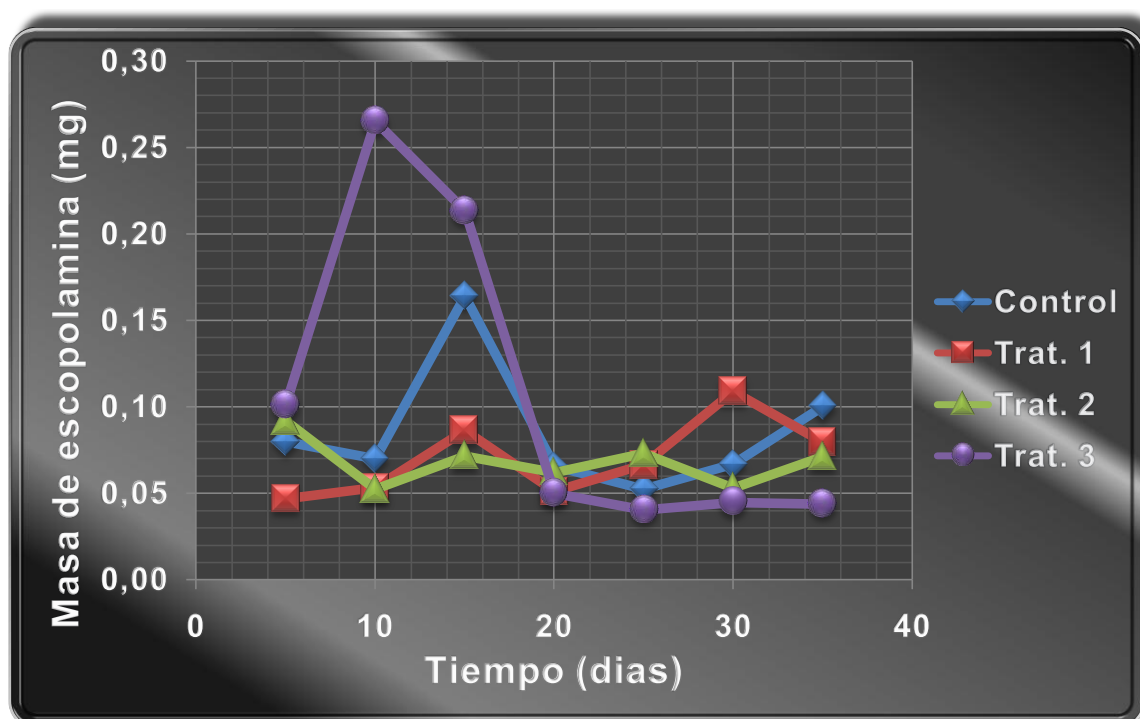


Figura 10 Masa neta de escopolamina en el control y los tres ensayos en raíces normales *in vitro* de *B. candida* elicidadas con L-Arginina

El tratamiento 1 tuvo mayor producción de escopolamina que el control solo en los días 25 al 35; en el caso del tratamiento 2 la masa del alcaloide superó al respectivo control en la primera medición el día 5 y la quinta medición el día 25, sin que haya periodos continuos de sobreproducción. El tratamiento 3 por su parte presentó una producción mayor al control muy marcada durante los primeros veinte días del experimento siendo el mejor caso el día 10 con 0.26 mg.

La producción neta de alcaloides se observa en la figura 10. El tratamiento 3 produce la mayor cantidad de escopolamina, en el día 10, se produjo 0.26 mg, seguido por el control al día 15, con 0.16 mg; el tratamiento 1 presentó su máxima producción al día 30 con 0.11 mg. El tratamiento 2 fue el que presentó la producción neta más baja de escopolamina en el transcurso del experimento, cuyo máximo está en la primera medición con 0.9 mg.

5.4. Adición de L-Arginina como Precursor Exógeno

Con el objetivo de observar el efecto de la adición al medio de cultivo de L-Arginina sobre la producción de escopolamina, se llevaron a cabo tres tratamientos suplementados con 10, 100 y 1000 mg/L de L-Arginina, respectivamente. La elección de L-Arginina no es arbitraria, como se presentó en la figura 3, este aminoácido participa en las etapas iniciales de la biosíntesis de los alcaloides del tropano, hecho que está demostrado y bien documentado desde hace algún tiempo (Nussbaumer et al., 1998). A Leete, (1975) se le atribuyen las investigaciones que revelaron las etapas iniciales en la biosíntesis de alcaloides del tropano y la cocaína, fue quien primero confirmó a ornitina y arginina como precursoras de estos alcaloides (Humphrey y O'Hogan, 2001).

El estímulo para la producción de MS puede ser llevada a cabo por medio de cultivo *in vitro*, como lo han demostrado Häkkinen et al., (2005) al adicionar a cultivos de células en suspensión de *N. tabacum* suplementos exógenos para la producción de alcaloides de la nicotina, con buenos rendimientos. De igual manera Kang et al., (2004) concluyeron que la biosíntesis de los alcaloides del tropano *in vitro*, puede ser influenciada por las condiciones de cultivo, el empleo de tejidos diferenciados y el desarrollo del explante. Por lo tanto, la elicitación con L-Arginina puede estimular la producción de alcaloides del tropano en raíces normales cultivada *in vitro* de *B. candida*.

La adición de L-Arginina a 10 mg/L no tiene un efecto significativo sobre el crecimiento de las raíces, pero al ser incorporada a concentraciones de 100 mg/L y 1000 mg/L causa una reducción severa al crecimiento de las raíces, efecto que podrían estar asociado a la producción de MS (ver figura 9 y 10) o al efecto tóxico ejercido por el precursor a estas concentraciones empleadas.

Las plantas pueden producir metabolitos que pueden ser tóxicos para ellas mismas (Goossens et al., 2003). En la figura 9, en el tratamiento 3 se observó una producción cerca de cinco veces superior a la del control, en el día 15; no obstante, dicho tratamiento desde la primera medición en el día 5 presentó una sobreproducción de escopolamina que puede ser tóxica para las raíces

normales cultivadas *in vitro*, afectando su crecimiento y posterior biosíntesis de los MS. Las raíces del tratamiento 2 muestran una concentración de escopolamina 1.5 veces mayor a la del control después del día 8; a pesar que esta diferencia en la producción es mucho menor en comparación con el tratamiento 3, que tiene una concentración 5 veces la del control del día 15.

Estos efectos pueden variar de una especie a otra como lo han demostrado Häkkinen et al., (2005) al elicitar raíces transformadas de diferentes especies con hiosciamina a 200 mg/L. Este alcaloide en el medio de cultivo inhibió el crecimiento de todos los clones empleados y analizados. Por otra parte, en las especies trabajadas por Nussbaumer et al., (1998), la adición de precursores al medio de cultivo no afectó la producción de la biomasa en los casos estudiados.

Por lo anterior, es válido relacionar la producción de MS con el crecimiento de la biomasa como lo ha propuesto Jouhikainen et al., (1999), en el sentido que la producción de MS está relacionada con un crecimiento pobre de las raíces; por lo tanto, la producción neta permanece baja, lo cual puede ser el resultado del efecto tóxico del MS sobre - producido, ya que las plantas mantienen su homeóstasis y la alteración de sus equilibrios puede ser nociva para las mismas.

La relación entre la producción de los MS y la biomasa que se encontró en esta investigación de forma contundente entre el control y el tratamiento 1. La concentración de escopolamina en el tratamiento 1, supera la del control como se observa en la figura 9; a su vez, en la figura 8 se observó que la biomasa de las raíces del tratamiento 1 está por debajo del control en los mismos días.

Khanam et al., (2001) encontraron en explantes de *Duboisia myoporoides* que la biosíntesis de alcaloides del tropano fue reprimida por la organogénesis de los brotes. Esta ausencia de alcaloides en los brotes de dos semanas de edad y su presencia a las seis semanas en los mismos, indica que la producción de escopolamina e hiosciamina está relacionada con el estado de diferenciación; sin embargo, este estado necesario para la biosíntesis de alcaloides del tropano, depende del tipo de explante, la especie vegetal y las condiciones del medio de cultivo.

Por lo descrito en el párrafo anterior Spollansky et al., (2000) emplearon en su investigación raíces transformadas y cultivos indiferenciados. Este comportamiento se puede distinguir al comparar las figuras 7, 8, 9 y 10. En el control y el tratamiento 1, la producción de escopolamina especialmente tiende a disminuir, aunque de una manera no muy pronunciada, con el aumento de biomasa de las raíces, por lo que su crecimiento reprime en alguna medida la biosíntesis de los alcaloides. En el tratamiento 2 se puede presentar un efecto tóxico del precursor L-Arginina que impide el desempeño metabólico normal de las raíces y por consiguiente su crecimiento y producción de alcaloides. En el tratamiento 3 debe primar el efecto de la producción de MS.

De acuerdo con los datos obtenidos la adición del L-Arginina como precursor al medio de cultivo, tiene efecto sobre el crecimiento de las raíces y su correlación

con la biosíntesis de alcaloides del tropano. El primer efecto ya fue explicado, pero la participación en la biosíntesis puede ser algo más complicado, como se presenta en la siguiente sección.

5.4.1. Biosíntesis de los Alcaloides del Tropano

Los estudios más detallados sobre la participación de L-Arginina en la biosíntesis de alcaloides del tropano fueron llevados a cabo por Robins et al., (1990a); Robins et al., (1990b) y Robins et al., (1991). En la primera fase de estos estudios se descubrió que la arginina descarboxilasa (ADC) (como se presentó en la figura 3) mostró un nivel de actividad más alto que la ornitina descarboxilasa (ODC) y a su vez ADC fue más sensible negativamente a la adición de precursores como agmatina.

Por los resultados de estas investigaciones se podría esperar que la adición de L-Arginina al medio de cultivo resultaría en un incremento en la producción de escopolamina, pero no fue así; las figuras 9 y 10 muestran que solo el tratamiento 3 tuvo una diferencia significativa en la producción de escopolamina en los primeros días de cultivo. Por el contrario, en los tratamientos 1 y 2 la adición del precursor llegó a tener un efecto negativo. La ruta biosintética de alcaloides del tropano es larga y compleja (ver figura 3) y funciona de una manera complicada.

En primer lugar en los experimentos de referencia se encontró que ADC y ODC (ver figura 11) presentan un potencial enorme limitante del flujo, en contraste con las otras enzimas de la ruta biosintética (putrescina N-metiltransferasa, PMT; diamina oxidasa, DAO; tropinona reductasa, TR; e hiosciamina 6 β -hidroxilasa, H6H), hecho que fue comprobado por Nussbaumer et al., (1998). Esto quiere decir que un exceso de L-Arginina u L-Ornitina no garantizan una sobreproducción de los alcaloides del tropano, porque no se dispone de una actividad suficiente de ODC o ADC para metabolizarlos y por consiguiente que sean incorporados e ingresen a la ruta biosintética.

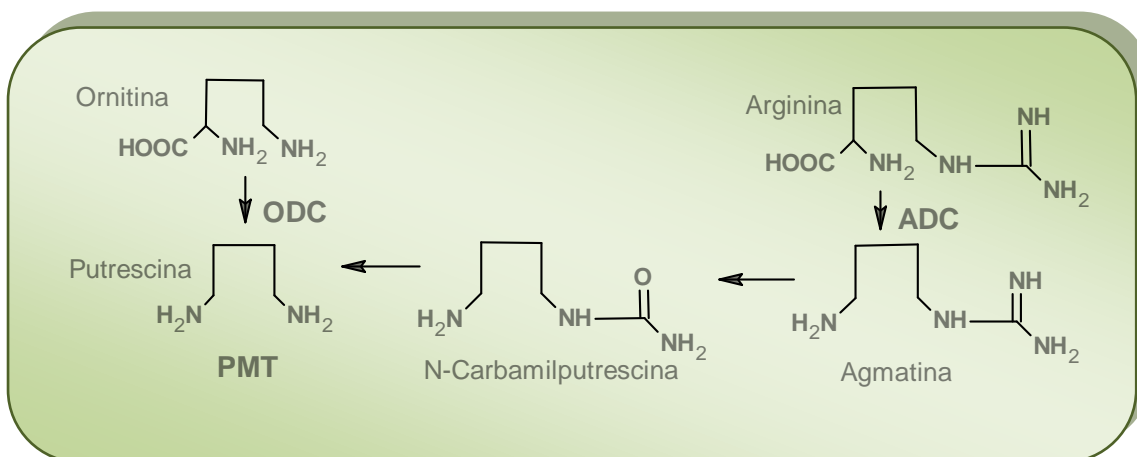


Figura 11 Ruta biosintética de la putrescina

De acuerdo con Zhang et al., (2004) es posible incrementar la productividad si se estimula la enzima limitante del flujo, que para este trabajo se logró con el

tratamiento 3 sobre la ADC; pero a pesar de esto, muchas rutas biosintéticas tienen más de un paso limitante al flujo. Moyano et al., (2007) definió dos enzimas claves para la biosíntesis de alcaloides del tropano, la PMT Y H6H, puesto que su sobreexpresión indujo una alta producción de escopolamina. De igual manera Humphrey et al., (2001) encontró que la reducción de la tropina, para la formación de escopolamina, realizada por la enzima TR-I (tropinona reductasa-I) compite con TR-II (tropinona reductasa-II) que produce las calistegeninas y sigue la misma ruta biosintética de los alcaloides del tropano.

Además, de estos pasos se ha encontrado que la esterificación de la tropina representa una limitante severa al flujo, llegando a la conclusión que la regulación para la formación de alcaloides del tropano es compleja, con un número de sitios potenciales en los cuales puede ocurrir restricción al flujo (Robins et al., 1991a) hecho que está de acuerdo a lo planteado por Häkkinen et al., (2005) al considerar que el problema principal para la sobreproducción escopolamina, es la complejidad de las rutas biosintéticas en las cuales se desconocen enzimas y genes reguladores claves en las vías que siguen los alcaloides del tropano (Li et al., 2006).

A pesar de lo anterior es posible incrementar la actividad de las enzimas para estimular la producción de los compuestos deseados, mediante su sobreexpresión y la elicitación con precursores (Zhang et al., 2004).

En el caso del tratamiento 3 se mostró una sobreproducción de escopolamina, lo cual puede indicar que bajo ciertas condiciones puede ocurrir una activación general del flujo hacia la formación de alcaloides. En este trabajo solo se presenta un resultado que debe ser sujeto a futuros estudios para clarificar este comportamiento de las raíces normales sobre la biosíntesis de MS.

5.5. Identificación y Cuantificación de Escopolamina

Las raíces cultivadas *in vitro* de *B. cándida* del control y los tres tratamientos, producen alcaloides del tropano. Como se comprobó al evaluar por TLC y HPLC muestras que permitieron evidenciar la presencia de escopolamina.

TLC: se realizaron cromatografías en placas de alúmina, reveladas con el reactivo de Dragendorff y utilizando como eluyente 2 mL del sistema CH₂Cl₂:MeOH:H₂O (85:14:1, v/v/v) dando los siguientes resultados:

Muestra	R _f
Patrón	0.44
Extracto	0.41

R_f: Factor de retardo

HPLC: se hicieron inyecciones de estándares y de extractos. La fase móvil que permitió una separación e identificación óptima fue la de Buffer de fosfato de

potasio 30 mM a pH 6.0-metanol (80:20). En estas condiciones experimentales en ambos casos la escopolamina presentó un tiempo de retención $t_r = 0.796$ min como se muestra en la figura 12.

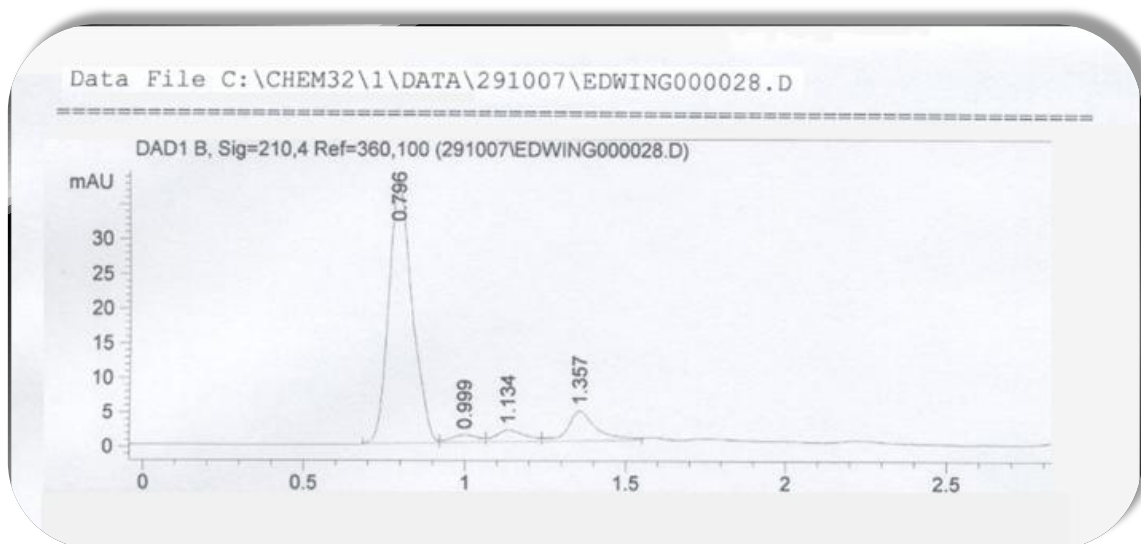


Figura 12 Reporte cromatográfico de la cuantificación de escopolamina en raíces normales *in vitro* elicitadas con L-Arginina a 1000 mg/L

5.6. Validación del Método de Cuantificación de Escopolamina por HPLC

La validación del método de HPLC, que permitió cuantificar la concentración y producción de escopolamina del control y los tres tratamientos, se fundamentó en la curva de calibración realizada con las 6 soluciones estándar lo cual se muestra en la figura 13. A partir de esta curva de calibración se cuantificó la escopolamina en las muestras.

5.6.1 Curva de Calibración

A continuación se describen algunos parámetros importantes con relación a la validez del método empleado en este trabajo para evaluar escopolamina.

5.6.1.1. Linealidad

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta. El programa HP ChemStation calculó la curva de calibración con la curva de regresión que tiene los siguientes valores para la fórmula $Y = mX + b$:

- $m = 2.99530$
- $b = 54.27701$

La pendiente “m” se relaciona con la sensibilidad del método y “b” con el estimador de la ordenada al origen.

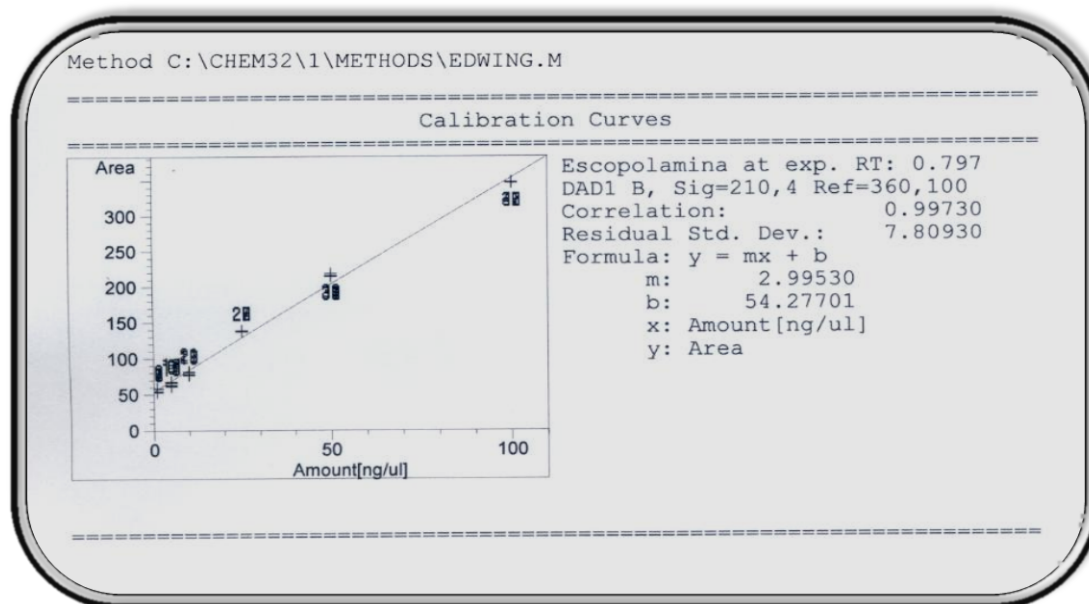


Figura 13 Curva de calibración de la escopolamina hecha en HPLC

5.6.1.2. Intervalos de Confianza de los Parámetros de Linealidad

Al realizar las operaciones presentadas en el anexo 3 con ayuda del programa Microsoft Office Excel 2007 se determinaron los siguientes valores:

$S_{x,y}^2$	S_m	S_b	Intervalo de "m"	Intervalo de b
60.9990	0.034860	1.6382	2.9270;3.0636	51.0661;57.4879

Estos resultados presentan rangos pequeños, entonces se tiene una alta probabilidad que los datos reportados sean exactos.

El valor lejos del origen de $b = 54.27701$ obtenido para la cuantificación de escopolamina es común en estos experimentos, como se observa en los trabajos de Mroczek et al., (2006) con $b = -69.14$ y de Kursinszki et al., (2005) con $b = -52.16$; aunque en otros trabajos se puede destacar la cercanía de "b" al origen como en los trabajos de Dupraz et al., (1993) con $b = -0.035$ y de Gallego et al., (2003) con $b = 1.95$. Por lo anterior podemos concluir que el valor de b es variable según la metodología empleada y que se acepta en un amplio rango de valores.

Por su parte el valor de $m = 2.99530$ obtenido para la cuantificación de escopolamina es cercano con el encontrado en algunas referencias bibliográficas, siendo $m = 1.267$ para Dupraz et al., (1993) y $m = 2.419$ para Gallego et al., (2003) quienes trabajaron en el mismo laboratorio. Pero en algunos casos se muestra como un valor bajo si lo comparamos con el $m = 16.992$ de Mroczek et al., (2006) y el $m = 18.058$ de Kursinszki et al., (2005). Cabe destacar que un valor alto de "m" indica una alta sensibilidad que depende de la elección del método analítico, que para este trabajo es

aceptable por presentar, como para el caso de “b”, un amplio rango de valores y por estar apoyado por otros parámetros estadísticos como el coeficiente de regresión lineal.

5.6.2. Coeficiente de Regresión Lineal

De acuerdo con Quattrocchi et al., (1992) el valor $r = 1$ indica una recta perfectamente lineal, $r = -1$ una recta perfectamente lineal de pendiente negativa y $r = 0$ la no correlación entre X y Y. En la práctica es generalmente mayor que 0.99, razón por la cual el “r” obtenido para escopolamina con la curva de calibración de la figura 13 de 0.99730 es aceptable e indica una buena correlación entre la concentración de escopolamina y la respuesta del equipo.

Además si comparamos el valor de “r” obtenido, con el $r = 0.99686$ de Mroczek et al., (2006), el $r = 0.99560$ de Theodoridis et al., (2003) y el $r = 0.99870$ de Kang et al., (2004) observamos que el $r = 0.99730$ de esta investigación indica una linealidad suficiente que permite tomar la curva de calibración de la figura 13 para la perfecta cuantificación de escopolamina sin importar que sea un valor inferior al $r = 0.99971$ de Gallego et al., (2003) y $r = 0.99996$ de Kursinski et al., (2005).

5.6.3. Precisión

La precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de un valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea (Quattrocchi et al., 1992).

La precisión del método analítico se estudio sobre las soluciones estándar (sistemas) (Quattrocchi et al., 1992) arrojando los resultados de la tabla 11.

Tabla 11 Precisión del método analítico y sus sistemas

Sistema (mg/L)	Área $\bar{X}^{(1)}$	S ⁽²⁾	RSD (%)	Límites de confianza
1	54.97086	2.11530	3.84804	52.85556;57.08616
5	63.96433	2.75333	4.30447	61.21100;66.71766
10	78.54420	1.81932	2.31630	76.72488; 80.36352
25	137.85589	0.51949	0.37684	137.33640;138.37538
50	215.83840	1.67624	0.77662	214.16216;217.51464
100	346.59099	0.51071	0.14735	346.08028;347.10170

(1) Área promedio

(2) Desviación estándar

Por la medida de RSD sobre los sistemas se tiene el efecto causado por las diluciones. Se observa que a medida que la concentración del sistema

disminuye el RSD tiende a aumentar, es decir, que se introduce error por cada dilución realizada, cuya magnitud depende de la técnica empleada y la experiencia del operador. Este hecho también fue demostrado por Kursinszki et al., (2005) en su trabajo con escopolamina al tener un RSD = 0.5 para una concentración de 40 mg/L y un RSD = 0.1 para su concentración de 100 mg/L. El error introducido por las diluciones es válido no solo para alcaloides del tropano, sino también para otro tipo de compuestos como los aminoácidos, hecho mostrado por Huang et al., (2003) con L-Arginina que para una concentración de 10 $\mu\text{mol/L}$ tuvo un RSD = 6.8 y para una concentración de 60 $\mu\text{mol/L}$ tuvo un RSD = 3.1.

De la tabla 11 se deduce un $\overline{\text{RSD}} = 1.9616\%$, menor al 2% internacionalmente aceptado y que nos indica que la curva de calibración de la figura 13 fue apropiada para la cuantificación de la escopolamina extraída de las raíces normales *in vitro* de *B. candida* elicitadas con L-Arginina (Quattrocchi et al., 1992).

CONCLUSIONES

- Se mantuvo las raíces de *Brugmansia candida* en condiciones *in vitro* empleando el medio nutritivo Schenk and Hildebrandt (SH) (1972) en estado líquido, suplementado con 3% de sacarosa y 3 mg/L de ANA con agitación sobre un shaker rotatorio a 80 rpm en la oscuridad y temperatura ambiente (21°C).
- La escopolamina fue identificada y cuantificada por HPLC, presentando un tiempo de retención de 0.796 min.
- La elicitación con L-Arginina aumento la producción de escopolamina en el tratamiento 3 y disminuyó el crecimiento de la biomasa en los tres tratamientos, proporcionalmente a su concentración.
- El experimento del tratamiento 3, fue el más apropiado para la obtención de escopolamina, con 1.0134% el día 15 (tiempo de cultivo corto, poca masa para la extracción y alta concentración de escopolamina en las raíces.)

RECOMENDACIONES

- Tomar más muestras por dato reportado y hacer un triplicado del experimento.
- Emplear la técnica de Extracción en Fase Sólida (EFS) en lugar de la extracción por Soxhlet.
- Realizar los experimentos con otro precursor como L-Ornitina combinado con el estudio de consumo de sacarosa y nitrógeno.
- Evaluar la presencia de escopolamina en el medio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arango, G. J. (2002). Alcaloides y compuestos nitrogenados. Universidad de Antioquia. Facultad de química farmacéutica. Medellín. 2-3.
2. Arteaga, L.; Perea, M.; Reguero, T. (1993). *Brugmansia* una especie promisorio para la producción de alcaloides del tropano. Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas; 21: 36-40.
3. Blechert, S.; Brodschelm, W.; Hölder, S.; Kammerer, L.; Kutchan, T. M.; Mueller, M. J.; Xia, Z. Q.; Zenk, M. H. (1995). The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 92: 4099-4105.
4. Catozzi, N.; Wasnaire, P.; Taylor, R. J. K. (2008). An efficient 1,2,4-triazine-based route to the lousianin alkaloids. The Tetrahedron Letters; 49: 2865-2868.
5. Deborah, A. R.; Bruce, N. C. (2002). Microbial transformation of alkaloids. Current Opinion in Microbiology; 5: 274-281.
6. Deng, F. (2005). Effects of glyphosate, chlorsulfuron, and methyl jasmonate on growth and alkaloid biosynthesis of jimsonweed (*Datura stramonium* L.). Pesticide; 82: 16-26.
7. Dräger, B. (2002). Analysis of tropane and related alkaloids. Journal of Chromatography A; 978: 1-35.
8. Dräger, B. (2006). Tropinone reductases, enzymes at the branch point of tropane alkaloid metabolism. Phytochemistry; 67: 327-337.
9. Dupraz, J. M.; Christen, P.; Kapetanidis, I. (1994). Tropane alkaloids in Transformed roots of *Datura quercifolia* L. Planta Med.; 60: 153-162.
10. Fuhshuku, K. I.; Mori, K. (2007). Synthesis of two piperidine alkaloids (-)-deoxoprosopinine and (-)-deoxoprosophylline, from 6-hydroxylated dihydrosphingosine derivatives. Tetrahedron Asymetry; 18: 2104-2107.
11. Gallego, C. M.; Osorio, J. N.; Mosquera, O. M.; Correa, Y. M. (2003). Production of scopolamine by normal root cultures of *Brugmansia candida*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture; 74: 289-291.
12. Giulietti, A. M.; Parr, A. J.; Rhodes, M. J. (1993). Tropane alkaloids production in transformed root cultures of *Brugmansia candida*. Planta Med.; 59: 428-430.
13. Gontier, E.; Clément, A.; Tran, T. L. M.; Gravot, A.; Lièvre, K.; Guckert, A.; Bourgaud, F. (2002). Hydroponic combined with natural or forced root permeabilization: a promising technique for plant secondary metabolite production. Plant Science; 163: 723-732.
14. Goossens, A.; Häkkinen, S. T.; Laakso, I.; Oskman-Caldentey, K. M.; Inzé, D. (2003). Secretion of secondary metabolites by ATP-Binding cassette transporters in plant cell suspension cultures. Plant Physiology; 131: 1161-1164.
15. Griffin, W. J.; Lin, G. D. (2000). Chemataxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. Phytochemistry; 53: 623-637.
16. Häkkinen, S. T.; Moyano, E.; Cusidó, R. M.; Palazón, J.; Piñol, M. T.; Oskman-Caldentey, K. M. (2005). Enhanced secretion of tropane alkaloids in *Nicotiana tabacum* hairy root expressing heterologous

- hyoscyamine-6 β -Hydroxylase. *Journal of Experimental Botany*; 56: 2611-2618.
17. Harborne, J. B.; Baxter, H. (1993). *Phytochemical Dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants*. Taylor and Francis, London.
 18. Hashimoto, T.; Yun, D. J.; Yamada, Y. (1993). Production of tropane alkaloid in genetically engineered root cultura. *Phytochemistry*; 32: 713-718.
 19. Huang, L. F.; Guo, F. Q.; Liang, Y. Z.; Hu, Q. N.; Cheng, B. M. (2003). Rapid simultaneous determination of arginine and methylated arginines in human urine by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*; 487: 145-153.
 20. Hegnauer, R. (1990). *Chemotaxonomie de Pflanzen*. Birkhäuser Verlag, Basel.
 21. Hibi, N.; Fujita, T.; Hatano, M.; Hashimoto, T.; Yamada, Y. (1992). Putrescine *N*-Methyltransferase in cultured roots of *Hyoscyamus albus*. *Plant Physiol*; 100: 826-835.
 22. Humphrey, A. J.; O'Hogan, D. (2001). Tropane alkaloid biosynthesis. A century old Problem unresolved. *Nat. Prod. Rep.*; 18: 494-502.
 23. Izquierdo, I.; Plaza, M. T.; Tamayo, J. A.; Yañes, V.; Lo Re, D.; Sánchez-Cantalejo, F. (2008). First total synthesis and absolute configuration of naturally occurring (-)-Hyacinthacine A₇ and its (-)-1-epi-isomer. *Tetrahedron*; 64: 4613-4618.
 24. Jordan, M.; Humam, M.; Bieri, S.; Christen, P.; Poblete, E.; Muños, O. (2006). *In vitro* shoot and root organogenesis, plant regeneration and production of tropane alkaloids in some species of *Schizanthus*. *Phytochemistry*; 67: 570-578.
 25. Jouhikainen, K.; Lindgren, L.; Jokelainen, T.; Hiltunen, R.; Teeri, T. H.; Oskman-Caldentey, K. M. (1999). Enhancement of scopolamine production in *Hyoscyamus muticus* L. hairy root cultures by genetic engineering. *Planta*; 208: 545-551.
 26. Julsing, M. K.; Koulman, A.; Woerdenbag, H. J.; Quax, W. J.; Kayser, O. (2006). Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites. *Biomolecular Engineering*; 23: 265-279.
 27. Jung, H. Y.; Kang, S. M.; Kang, Y. M.; Kang, M. J.; Yun, D. J.; Bahk, J. D.; Yang, J. K.; Choi, M. S. (2003). Enhanced production of scopolamine by bacterial elicitors in adventitious hairy root cultures of *Scopolia parviflora*. *Enzyme and Microbial Technology*; 33: 987-990.
 28. Kang, Y. M.; Min, J. Y.; Moon, H. S.; Karigar, C. S.; Prasad, D. T.; Lee, C. H.; Choi, M. S. (2004). Rapid *in vitro* adventitious shoot propagation of *Scopolia parviflora* through rhizome cultures for enhanced production of tropane alkaloids. *Cell Biology and Morphogenesis*; 23: 128-133.
 29. Khanam, N.; Khoo, C.; Close, R.; Khan, A. G. (2001). Tropane alkaloid production by shoot culture of *Duboisia myoporoides* R. Br. *Phytochemistry*; 56: 59-65.
 30. Kosar, M. P.; Laman, J. D.; Fox, A. (2002). Muramic acid is not generally present in the human spleen as determined by gas Chromatography-tande mas spectrometry. *Infection and Immunity*; 70: 741-748.
 31. Kroker, K. (2004). Epidemic encephalitis and American neurology, 1919-1940. *Bull. Hist. Med.*; 78: 108-147.

32. Kursinszki, L.; Hank, H.; László, I.; Szőke, É. (2005). Simultaneous analysis of hyoscyamine, scopolamine, 6 β -hydroxyhyoscyamine and apoatropine in Solanaceous hairy roots by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*; 1091: 32-39.
33. Li, R.; Reed, D. W.; Liu, E.; Nowak, J. (2006). Functional genomics analysis of alkaloid biosynthesis in *Hioscyamus niger* reveals a cytochrome P450 involved in littorine rearrangement. *Chemistry & Biology*; 13: 513-520.
34. Liscombe, D. K.; Facchini, P. J. (2008). Evolutionary and cellular webs in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *Current Opinion of Biotechnology*; 19: 1-8.
35. Luo, X.; Chen, B.; Yao, S. (2005). Simultaneous analysis of protoberberine, indolequinoline and quinoline alkaloids in coptis-evodia herb couple and the Chinese herbal preparations by High-Performance Liquid Chromatography-electrospray mass spectrometry. *Talanta*; 66: 103-110.
36. Mateus, L.; Cherkaoui, S.; Christen, P.; Veuthey, J. L. (1998). Capillary electrophoresis for the analysis of tropane alkalids: pharmaceutical and phytochemical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 18: 815-825.
37. McCalley, D. V. (2002). Analysis of the *Chinchona* alkaloids by high performance liquid chromatography and other separation techniques. *Journal of Chromatography A*; 967: 1-19.
38. Min, J. Y.; Jung, H. Y.; Kang, S. M.; Kim, Y. D.; Kang, Y. M.; Park, D. J.; Prasad, D. T.; Choi, M. S. (2007). Production of tropane alkaloids by small-scale bubble column bioreactor cultures of *Scopolia parviflora* adventitious roots. *Bioresource Technology*; 98: 1748-1753.
39. Molyneux, R. J.; Gardner, D. R.; James, L. F.; Colegate, S. M. (2002). Polyhydroxy alkaloids: chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*; 967: 57-74.
40. Morrison, A. R. (2002). Perverting medical history in the service of "Animal Rights". *Perspectives in Biology and Medicine*; 45: 606-619.
41. Moyano, E.; Palazón, J.; Bonfill, M.; Osuna, L.; Cusidó, R. M.; Oskman-Caldentey, K. M.; Piñol, M. T. (2007). Biotransformation of hyoscyamine into scopolamine in transgenic tobacco cell cultures. *Journal of Plant Physiology*; 164: 521-524.
42. Mroczek, T.; Glowina, K. K.; Kowalska, J. (2006). Solid-liquid extraction and cation-exchange solid-phase extraction using a mixed-mode polymeric sorbent of *Datura* and related alkaloids. *Journal of Chromatography A*; 1107: 9-18.
43. Nussbaumer, P.; Kapétanidis, I.; Christen, P. (1998). Hairy roots of *Datura candida* X *D. aurea*: effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis. *Plant Cell Reports*; 17: 405-409.
44. O'Hogan, D.; Robins, R. J. (1998). Tropic acid ester biosynthesis in *Datura stramonium* and related species. *Chemical Society Reviews*; 27: 207-212.
45. Olsen, J.M. (2006). Depression SSRIs, and the supposed obligation to suffer mentally. *Kennedy Institute of Ethics Journal*; 16:283-303.

46. Pfister, J. A.; Panter, K. E.; Gardner, D. R.; Stegelmeier, B. L.; Ralphs, M. H.; Molyneux, R. J.; Lee, S. T. (2001). Alkaloids as anti-quality factors in plants on western U. S. rangelands. *Journal of Range Management*; 54: 447-461.
47. Pitta-Alvares, S.; Giulietti, A. (1995). Advantages and limitation in the use of hairy root cultures for the production of tropane alkaloids: use of antiauxins in the maintenance of normal roots morphology. *In vitro cell Rev. Biol.*; 31: 220-221.
48. Plank, K. H.; Wagner, K. G. (1986). Determination of hyoscyamine and scopolamine in *Datura innoxia* plants by high performance liquid chromatography. *Zeitung für Naturforschung*; 41: 391.
49. Quattrocchi, O. A.; Andrizzi S. A.; Laba, R. F. (1992). Introducción a la HPLC. Artes Gráficas Farro S.A. California 2750/52 (1289) Buenos Aires: 47-48, 301-328.
50. Robins, R. J.; Parr, A. J.; Bent, E. G.; Rhodes, M. J. C. (1991a). Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura stramonium* L. Transformed root cultures. 1. The kinetics of alkaloid production and the influence of feeding intermediate metabolites. *Planta*; 183: 185-195.
51. Robins, R. J.; Parr, A. J.; Walton, N. J. (1991b). Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura stramonium* L. transformed root cultures. 2. on the relative contributions of L-arginine and L-ornithine to the formation of the tropane ring. *Planta*; 183: 196-201.
52. Robins, R. J.; Parr, A. J.; Payne, J.; Walton, N. J.; Rhodes, M. J. C. (1990). Factors regulating tropane-alkaloid production in a transformed root culture of a *Datura candida* X *D. aurea* hybrid. *Planta*; 181: 414-422.
53. Rothe, G.; Garske, U.; Dräger, B. (2001). Calystegines in root cultures of *Atropa belladonna* respond to sucrose, not to elicitation. *Plant Science*; 160: 1043-1053.
54. Rout, G. R.; Mohapatra, A.; Jain, S. M. (2006). Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*; 24: 531-560.
55. Sato, F.; Hashimoto, T.; Hachiya, A.; Tamura, K.; Choi, K.; Morishige, T.; Fujimoto, H.; Yamada, Y. (2001). Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1: 367-372.
56. Schenk, R. V.; Hildebrandt, A. C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J. Bot.*; 50: 199-204.
57. Schmidt, J. D.; Evans, D.L. (1990). Adaptive mechanisms and strategies of prey and predator. *Insect defenses*. New York Press. 1-2.
58. Schulz, H.; Baranska, M. (2007). Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*; 43: 13-25.
59. Spollansky, T. C.; Pitta-Alvares, S.; Giulietti, A. M. (2000). Effect of jamonic acid and aluminum on production of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Electronic Journal of Biotechnology*; 3: 71-75.
60. Steenkamp, P. A.; Harding, N. H.; Van Heerden, F. R.; Van Wyk, B. E. (2004). Fatal *Datura* poisoning: identification of atropine and scopolamine by high performance liquid chromatography/photodiode array/mass spectrometry. *Forensic Science International*; 145: 31-39.

61. Stöckigt, J.; Sheludko, Y.; Unger, M.; Gerasimenko, I.; Warzecha, H.; Stöckigt, D. (2002). High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic-electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid group. *Journal of Chromatography A*; 967: 85-113.
62. Theodoridis, G.; Kantifes, A.; Manesiotis, P.; Raikos, N.; Tsoukali-Papadopoulus, H. (2003). Preparation of a molecularly imprinted polymer for the solid-phase extraction of scopolamine with hyoscyamine as a dummy template molecule. *Journal of Chromatography A*; 987: 103-109.
63. Tiburcio, A. F.; Kaur-Sawmney, D.; Ingersoll, R. B.; Galston, A. W. (1985). Correlation between polyamines and pyrrolidine alkaloids in developing tobacco callus. *Plant Physiol*; 78: 323-326.
64. Wink, M. (1999). Biochemistry of plant secondary metabolism. *Annual Plant Reviews Vol. 2*. Sheffield Academic Press, Sheffield.
65. Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*; 64: 3-19.
66. Winter, A. (2005). The making "The Truth serum". *Bull. His. Med.*; 79: 500-533.
67. Yamada, T.; Endo, T. (1984). Tropane alkaloid production in cultured cells of *Duboisia leichhardtii*. *Plant Cell Report*; 3: 186-188.
68. Yazaki, K. (2006). ABC Transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Letters*; 580: 1183-1191.
69. Yin, J.; Xu, Y.; Li, J.; Wang, E. (2008). Analysis of quinolizidine alkaloids in *Sophora flavescens* Ait. by capillary electrophoresis with tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium (II)-based electrochemiluminescence detection. *Talanta*; 75: 38-42.
70. Yoshimatsu, K.; Sudo, H.; Kamada, H.; Kiuchi, F.; Kikuchi, Y.; Sawada, J. I.; Shimomura, K. (2004). Tropane alkaloid production and shoot regeneration in hairy and adventitious root cultures of *Duboisia myoporoides*-*D. leichhardtii* hybrid. *Biol. Pharm. Bull.*; 27: 1261-1265.
71. Zanolari, B.; Wolfender, J. L.; Guilet, R.; Martson, A.; Queiros, E. F.; Paulo, M. Q.; Hostelt-Mann, K. (2003). On-line identification of tropane alkaloids from *Erythroxylum vacciniifolium* by liquid chromatography-uv detection multiple mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*; 1020: 75-89.
72. Zhang, L.; Ding, R.; Chai, Y.; Bonfill, M.; Moyano, E.; Oskman-Caldentey, K. M.; Xu, T.; Pi, Y.; Wang, Z.; Zhang, H.; Kai, G.; Liao, Z.; Sun, X.; Tang, K. (2004). Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. *PNAS*; 101: 6786-6791.

ANEXO 1

Tabla 12 Preparación del medio de cultivo Schenk and Hildebrand (SH)(1972).

Stock número	Componente	Masa (mg)	Llevar a volumen de (mL)	[] sin Stock (mg/L)	Volumen a tomar para 1 L de medio	Concentración final (mg/L)
1	KNO ₃	2500	*	*	*	2500
2	MnSO ₄ •H ₂ O	165	25	6600	2	11.2
	MgSO ₄ •7H ₂ O	5000		200000		400
	ZnSO ₄ •7H ₂ O	12.5		500		1
3	H ₃ BO ₃	50	10	5000	1	5
	CuSO ₄ •5H ₂ O	1		312		0.3125
	KI	10		1000		1
	Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	2		100		0.1
	CoCl ₂ •6H ₂ O	3		100		0.1
4	NH ₄ H ₂ PO ₄	3750	25	150000	2	300
5	Na ₂ EDTA•2H ₂ O	250	25	10000	2	20
	FeSO ₄ •7H ₂ O	187.5		7500		15
6	CaCl ₂ •2H ₂ O	2500	25	100000	2	200

¹Solución 1. Pesar 10 mg de CuSO₄•5H₂O, disolver en 10 mL de agua.

²Solución 2. Pesar 10 mg de Na₂MoO₄•2H₂O, disolver en 10 mL de agua.

³Solución 3. Pesar 10 mg de CoCl₂•6H₂O, disolver en 10 mL de agua.

Tomar 3.125 mL de la solución 1, 1.0 mL de la solución 2, 1.0 mL de la solución 3 y aforar a 10 mL.

Tabla 13 Preparación de vitaminas para el medio SH (Gallego et al., 2003)

Vitamina	Masa (mg)	Volumen final (mL)	Concentración de la solución (mg/L)	Vol. Para 1 L de medio SH (mL)	Concentración final (mg/L)
Niacina	10	10	1000	5.0	5.0
Piridoxina	10	10	1000	0.5	0.5
Tiamina	10	10	1000	5.0	5.0
Mioinositol	1000	*	*	*	1000

ANEXO 2

Diagrama de flujo para preparar 1.0 L de medio de cultivo líquido Schenk y Hildebrant (SH) (1972)

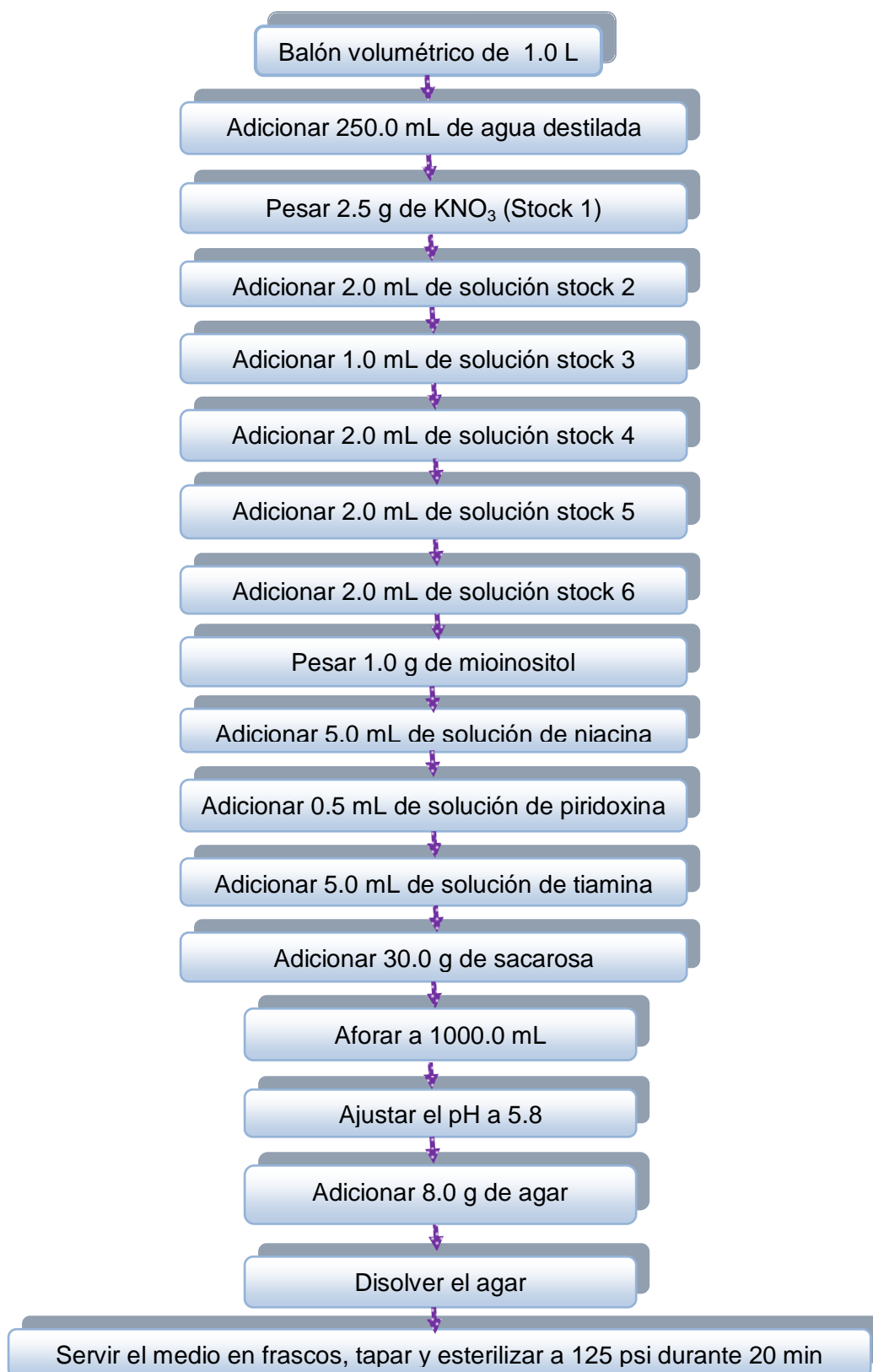


Figura 14 Diagrama de flujo para preparar 1.0 L de medio de cultivo SH

ANEXO 3

En este anexo se presentan las ecuaciones con las que se desarrolló la validación del método analítico y se realizó la regresión lineal de las curvas de crecimiento.

❖ Linealidad

Para la ecuación $Y = mX + b$:

$$m = \frac{\sum (X_i \cdot Y_i) - \frac{\sum X_i \cdot \sum Y_i}{n}}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}$$

$$b = \frac{\sum Y_i - m \sum X_i}{n}$$

❖ Coeficiente de Regresión Lineal

$$r = \frac{\sum (X_i \cdot Y_i) - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sqrt{\left[\left(\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n} \right) \left(\sum Y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{n} \right) \right]}}$$

❖ Intervalos de Confianza

$$S_m = \sqrt{\frac{S_{x,y}^2}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}}$$

$$S_{x,y}^2 = \frac{\sum Y_i^2 - b \cdot \sum Y_i - m \cdot \sum (X_i \cdot Y_i)}{n - 2}$$

$$S_b = \sqrt{\left(S_m^2 \cdot \frac{\sum X_i^2}{n} \right)}$$

Donde "n" es el número de las medidas, "X_i" es el valor de las concentraciones y "Y_i" es el valor del área medido en el ensayo.

❖ **Presición**

$$S = \sqrt{\left[\frac{\sum_{i=1}^n (Xi - \bar{X})^2}{n - 1} \right]}$$

Donde " \bar{X} " es el estimador de la media poblacional μ , calculado como:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n Xi}{n}$$

$$RSD = \frac{S \cdot 100}{\bar{X}}$$

Donde "n" es el número de las medidas y " Xi " es el valor medido en el ensayo.